



โครงการ  
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ ความสัมพันธ์ระหว่าง rs966423 และมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด differentiated  
ในประเทศไทย  
Association between rs966423 and differentiated thyroid cancer in  
Thailand

ชื่อนิสิต นางสาวมลพกา สิงห์พรม เลขประจำตัว 5832137823

ภาควิชา พุทธศาสตร์

ปีการศึกษา 2561

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการทางวิชาการที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of senior projects in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the senior project authors' files submitted through the faculty.

ความสัมพันธ์ระหว่าง rs966423 และมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด differentiated ใน  
ประชากรไทย

นางสาวมลผกา สิงห์พรหม

โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์  
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2561

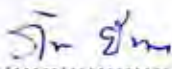
Association between rs966423 and differentiated thyroid cancer in Thai  
population

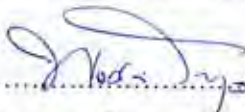
Miss Monpaka Singprom

A Senior Project in Partial Fulfillment of the Requirements  
For the Degree of Bachelor of Science in Genetics  
Department of Botany  
Faculty of Science, Chulalongkorn University  
Academic Year 2018

ชื่อโครงการวิทยาศาสตร์	ความสัมพันธ์ระหว่าง rs966423 และมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด differentiated ในประชากรไทย Association between rs966423 and differentiated thyroid cancer in Thai population
ชื่อนิสิต	นางสาวมลลภา ลิงห์พรม
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภัทรา ยีทอง
ปีการศึกษา	2561

ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยอนุมัติให้นับโครงการวิทยาศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์

  
.....อาจารย์ที่ปรึกษา  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภัทรา ยีทอง)

  
.....กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล)

  
.....กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เพลินพิศ ไชคชัยชำนาญกิจ)

ลิขสิทธิ์ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการวิทยาศาสตร์	ความสัมพันธ์ระหว่าง rs966423 และมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด differentiated ในประชากรไทย
ชื่อนิสิต	นางสาวมณฑกา สิงห์พรม
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภัทรา ยี่ทอง
ปีการศึกษา	2561

### บทคัดย่อ

มะเร็งต่อมไทรอยด์เป็นมะเร็งที่พบมากที่สุด ในมะเร็งที่เกิดในระบบต่อมไร้ท่อ ปัจจัยเสี่ยงของการเกิดมะเร็งต่อมไทรอยด์มีหลากหลายปัจจัยทั้งจากสิ่งแวดล้อมและพันธุกรรม การศึกษา genome-wide association studies (GWAS) ในประชากรประเทศสหรัฐอเมริกาพบว่า พหุสัณฐานนิวคลีโอไทด์เดี่ยว (SNP) ของตำแหน่ง rs966423 มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งต่อมไทรอยด์ โดย rs966423 (C>T) เป็น SNP ที่อยู่ในบริเวณอินทรอนที่ 3 ยีน *DIRC3* มีความสัมพันธ์กับการลดลงของฮอร์โมน Thyroid Stimulating hormone (TSH) ในผู้ป่วยมะเร็งต่อมไทรอยด์ นอกจากนี้ยังมีความสัมพันธ์กับมะเร็งต่อมไทรอยด์ในประชากรอีกหลายประเทศ เนื่องจากยังไม่เคยมีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง rs966423 และมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด differentiated (DTC) ในประเทศไทยมาก่อน ในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการศึกษาในผู้ป่วยมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC จำนวน 223 ตัวอย่างโดยมีกลุ่มควบคุมคือคนปกติที่ไม่มีประวัติครอบครัวเป็นโรคเกี่ยวกับต่อมไทรอยด์ จำนวน 178 ตัวอย่าง จากการตรวจสอบจีโนไทป์ของ rs966423 โดยวิธี PCR-RFLP พบว่าในผู้ป่วยมีค่าความถี่แอลลีล C เท่ากับ 0.90 ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีค่าความถี่แอลลีล C เท่ากับ 0.86 ค่า odds ratio เท่ากับ 1.45 (95%CI = 0.95-2.23, p-value = 0.08) ซึ่งแสดงว่าความถี่ของ risk allele ไม่มีความแตกต่างกันในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC และกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งแตกต่างกับการศึกษาก่อนหน้า

คำค้นหา: มะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด differentiated; SNP; rs966423; PCR-RFLP

<b>Title</b>	Association between rs966423 and differentiated thyroid cancer in Thai population
<b>Student name</b>	Miss Monpaka Singprom
<b>Program</b>	Genetics
<b>Department</b>	Botany
<b>Advisor</b>	Assist. Prof. Dr. Patra Yeetong
<b>Academic year</b>	2018

---

### Abstract

Thyroid cancer is the most common cancer of the endocrine system cancers. There are several risk factors for thyroid cancer include, both environments and genetics. From Genome-wide Association Study (GWAS) in the United States population, a single nucleotide polymorphisms (SNP) at rs966423 was reportedly associated with thyroid cancer. rs966423 (C>T) locates in an intron 3 of the *DIRC3* gene which associated with the Thyroid Stimulating hormone (TSH) level decrease in thyroid cancer patients. Moreover, many studies also reported the association between rs966423 and thyroid cancer patients in several populations. In this study, rs966423 genotyping was performed using PCR-RFLP in 223 Thai DTC patients and 178 healthy controls. In patient group, the allele frequency of the C allele was 0.90 while that of the control group was 0.86. The odds ratio was found to be 1.45 (95%CI = 0.95-2.23, p-value = 0.08). These results indicated no significant difference of risk allele frequency between patient and control groups which is different from the previous studies.

**Keywords:** differentiated thyroid cancer; SNP; rs966423; PCR-RFLP

## กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภัทรา ยี่ทอง อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการที่กรุณาสั่งสอน อบรม และให้กำลังใจตลอดการทำโครงการในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พงศ์ธาวิณ ไล่ห์ตระภูล และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เพลินพิศ โชคชัยชำนาญกิจ ที่ให้คำแนะนำ แก้ไขรายงานฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. สุรัสวดี อัศวรัตน์ ที่ได้มอบตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด differentiated จากโรงพยาบาลศิริราชเพื่อใช้สำหรับการทดลอง

ขอกราบขอบคุณอาสาสมัครตัวอย่างกลุ่มควบคุม

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการ 306 ห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์ของภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสถานที่สำหรับการทำโครงการ ขอขอบคุณนางสาวสโรชา มิตรบัญญัติ นางสาวสุนิตา ชุณหกุล และสมาชิกในห้องปฏิบัติการทุกคนที่คอยให้คำปรึกษาและให้กำลังใจตลอดการทำโครงการ

ขอขอบคุณภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และอาจารย์ในภาควิชาทุกท่าน ที่คอยอบรมสั่งสอนและให้ความรู้โดยตลอดมา

ขอขอบคุณเงินทุนสนับสนุนโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา รวมทั้งเพื่อน ๆ พี่ ๆ และน้อง ๆ ทุกคน สำหรับกำลังใจและการสนับสนุนตลอดมา

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูปภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การตรวจเอกสารของงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินการ	12
บทที่ 4 ผลการทดลอง	17
บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผล	24
เอกสารอ้างอิง	26
ภาคผนวก	30



## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 ตัวอย่าง SNPs เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งต่อมไทรอยด์	8
ตารางที่ 3.1 ปริมาณสารในกระบวนการ PCR สำหรับ 1 ตัวอย่างการทดลอง	15
ตารางที่ 4.1 ขั้นตอนในกระบวนการ PCR	19
ตารางที่ 4.2 จีโนไทป์ที่พบในตัวอย่างที่ทำการทดลอง	21
ตารางที่ 4.3 ค่า P-value, OR และ 95%CI ของจีโนไทป์ทั้งหมด	22
ตารางที่ 4.4 ผลการคำนวณค่าทางสถิติ risk allele ของ rs966423	22
ตารางที่ 4.5 ผลการคำนวณค่าทางสถิติในตัวอย่างเพศหญิง	23
ตารางที่ 4.6 ผลการคำนวณค่าทางสถิติในตัวอย่างเพศชาย	23
ตารางที่ 6.1 ข้อมูลตัวอย่างที่ใช้ทำการทดลองกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC	31
ตารางที่ 6.2 ข้อมูลตัวอย่างที่ใช้ทำการทดลองกลุ่มควบคุม	43

## สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 2.1 ผลการศึกษา Genome-Wide Association Study (GWAS)	7
รูปที่ 2.2 Manhattan plot ยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC จากการทำ GWAS	10
รูปที่ 4.1 ลำดับเบสที่มีตำแหน่ง rs966423 และลำดับเบสที่ใช้เป็นไพรเมอร์	17
รูปที่ 4.2 แผนภาพจำลองผลการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>NlaIII</i> จากโปรแกรม NEB cutter 2.0	18
รูปที่ 4.3 ผลเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของการตรวจสอบผลของการทำ PCR	19
รูปที่ 4.4 ผลเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของการตรวจสอบผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>NlaIII</i>	20
รูปที่ 4.5 DNA sequencing ของ ก. allele CC, ข. allele CT และค. allele TT	21

## บทที่ 1 บทนำ

มะเร็งต่อมไทรอยด์ เป็นโรคที่พบได้ทุกช่วงอายุ พบในเพศหญิงมากกว่าเพศชายในสัดส่วน 3:1 ในปี 2011 มะเร็งต่อมไทรอยด์สามารถพบได้ติดอันดับ 1 ใน 10 ของผู้ป่วยมะเร็งต่อมไทรอยด์เพศหญิงในประเทศไทย ซึ่งส่วนใหญ่ในผู้ป่วยมะเร็งต่อมไทรอยด์เพศชายจะพบในช่วงอายุ 60 ปีขึ้นไป ส่วนผู้ป่วยเพศหญิงจะพบในช่วงอายุ 30-65 ปี และพบว่ามีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของผู้ป่วยมะเร็งต่อมไทรอยด์ในประเทศไทยมาเป็นอันดับต้น ๆ (Tangjaturonrasme, Vatanasapt and Bychkov, 2017)

มะเร็งต่อมไทรอยด์นั้นมี 3 ชนิด ได้แก่ ชนิด Differentiated Thyroid Carcinoma (DTC) ชนิด Medullary Thyroid Carcinoma (MTC) และชนิด Anaplastic Thyroid Carcinoma (ATC) (Verburg, Brans and Mottaghy, 2011) โดยมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC เป็นมะเร็งต่อมไทรอยด์ที่พบได้ใน 80% ของผู้ป่วยมะเร็งไทรอยด์ทั้งหมดและสามารถแบ่งแยกได้เป็น 2 ชนิดย่อย ได้แก่ ชนิด papillary thyroid carcinoma (PTC) พบได้ 85% ของผู้ป่วยมะเร็งไทรอยด์ชนิด DTC และชนิด follicular thyroid carcinoma (FTC) พบได้ 15% ของผู้ป่วยมะเร็งไทรอยด์ชนิด DTC (Gounden and Lee, 2013) ซึ่งมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด PTC เป็นชนิดที่มีความรุนแรงน้อยที่สุด

สาเหตุของการเกิดมะเร็งต่อมไทรอยด์มีหลากหลายสาเหตุ ได้แก่ การได้รับรังสีไอออไนซ์ เช่น จาก atomic bomb ในประเทศญี่ปุ่นหรือการได้รับการฉายรังสีบริเวณศีรษะและลำคอในวัยเด็ก เกิดการรั่วไหลของรังสีออกมาปริมาณสูงทำให้เกิดความเสียหายกับหน่วยพันธุกรรมของเซลล์ ส่งผลให้เซลล์ที่ต่อมไทรอยด์ทำงานผิดปกติไปจากเดิมทำให้กลายเป็นมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด PTC (Livolsi, 2011) ด้านการบริโภคอาหารก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC คือระดับของไอโอดีนในอาหาร ซึ่งจะส่งผลต่อการทำงานของฮอโมนไทรอยด์ โดยมีการศึกษาพบว่าบริเวณที่มีภาวะขาดไอโอดีนจะพบผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด FTC ส่วนในบริเวณที่มีการเสริมไอโอดีนจะพบผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด PTC เพิ่มขึ้น (Rahbari, Zhang and Kebebew, 2010) และอีกสาเหตุหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งต่อมไทรอยด์คือสาเหตุทางพันธุกรรม

งานวิจัยก่อนหน้านี้นี้ศึกษาความผิดปกติแบบ somatic mutation จากก้อนมะเร็งต่อมไทรอยด์ซึ่งเป็นการตรวจวิเคราะห์เพื่อยืนยันการเกิดโรค การวางแผนการรักษา ตลอดจนการพยากรณ์โรค โดยยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด PTC ได้แก่ ยีน *B-Raf Proto-oncogene, Serine/Threonine Kinase (BRAF)* ซึ่งจะสร้างโปรตีนที่ช่วยในการส่งสารเคมีจากนอกเซลล์เข้าสู่เซลล์ในกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการเจริญและการแบ่งเซลล์ มิวเทชันบนยีน *BRAF* ตำแหน่ง c.1799A>T (p.V600E) พบในผู้ป่วยมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC ประมาณ 30-69% ผู้ป่วยมะเร็งต่อมไทรอยด์ 40-70% พบมิวเทชันในยีน *Rearranged in Transformation/Papillary Thyroid Carcinomas (RET/PTC)* ซึ่งมิวเทชันที่พบบ่อยคือ RET/PTC1 (inv(10)(q11.2;q21)) และ RET/PTC3 (inv(10)(q11.2;q10)) อีกทั้งการได้รับรังสีมีส่วนทำให้เกิดมิวเทชันของ *RET/PTC*

(Nikiforov, 2002) นอกจากนี้ยีน RAS สร้างโปรตีนที่จำเป็นต่อการส่งสัญญาณไปควบคุมการเจริญ การเปลี่ยนแปลงและการอยู่รอดของเซลล์ (Medarde and Santos, 2011) ซึ่งพบการเกิดมิวเทชัน ของยีน RAS 10-20% ในมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด PTC และ 40-50% ในชนิด FTC โดยจะเกิด มิวเทชันที่โคดอน 12, 13 หรือ 61 ทำให้ไปยับยั้งการทำงานของ GTPase (Chien and Koeffler, 2012) โดยยีนทั้งหมดที่ได้กล่าวไปเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับ mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling pathway (Santarpia et al., 2010)

การศึกษาความผิดปกติทางพันธุกรรมแบบ germline สามารถใช้ทำนายความเสี่ยงในการ เกิดมะเร็งต่อมไทรอยด์ได้ เรียกว่า genetic predisposition หรือ genetic susceptibility กล่าวคือ เมื่อเกิดความผิดปกติบนยีนแล้วมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรค แต่อาจไม่ได้เป็นสาเหตุหลักของ การเกิดโรค (มลิวรรณ สุคันธพันธ์ และ ทิพย์วรรณ อรัญดร, 2555) ซึ่งจากการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่ามียีนที่เกี่ยวข้องจำนวนมาก เช่น *Forkhead Factor E1 (FOXE1)* บนโครโมโซม 9q22.33 เป็นยีนที่มีความจำเป็นต่อการซ่อมแซมของระยะการเปลี่ยนแปลงในต่อมไทรอยด์ เป็นศูนย์กลาง ของการผลิตฮอร์โมนไทรอยด์และควบคุมการหลั่งฮอร์โมน TSH และยีน *NK2 homeobox 1 (NKX2-1)* ทำหน้าที่ในการส่งสัญญาณในการเจริญของต่อมไทรอยด์ (Gudmundsson et al., 2009) นอกจากนี้ยังมียีนอื่นที่เกี่ยวข้องคือ ยีน *Disrupted in Renal Carcinoma 3 (DIRC3)* บน ตำแหน่ง 2q35 และยีน *Neuregulin 1 (NRG1)* บนตำแหน่ง 8p12 (Ho et al., 2016) เป็นต้น

จากการศึกษา Genome Wide Association Study (GWAS) ในประชากรประเทศ สหรัฐอเมริกา โดยศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของตำแหน่ง rs965513 rs944286 rs116909374 rs2439302 และ rs966423 กับการเกิดมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด PTC พบว่า SNPs ทั้ง 5 ตำแหน่งมีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด PTC โดย rs965513 มีค่า OR=1.81 CI= 1.62-2.04 และ p-value=8.20x10<sup>-24</sup> rs944289 มีค่า OR=1.23 CI=1.09-1.38 และ p-value=4.89x10<sup>-4</sup> rs116909374 มีค่า OR=1.90 CI=1.44-2.53 และ p-value=7.54x10<sup>-6</sup> rs2439302 มีค่า OR=1.30 CI=1.16-1.45 และ p-value=5.11x10<sup>-6</sup> และ rs966423 มีค่า OR=1.27 CI=1.14-1.42 และ p-value=2.18x 10<sup>-5</sup> (Jendrzewski et al., 2016)

rs966423 (C>T) เป็น SNP ที่อยู่บนยีน *DIRC3* บริเวณอินทรอนที่ 3 ตำแหน่ง 2q35 (Shen et al., 2016) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการลดลงของระดับฮอร์โมน Thyroid Stimulating hormone (TSH) ในผู้ป่วยมะเร็งต่อมไทรอยด์และมีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งต่อมไทรอยด์ใน กลุ่มประชากรในอีกหลายประเทศ ได้แก่ ไอซ์แลนด์ (Gudmundsson et al., 2013) ซึ่งพบว่า จีโนไทป์ TT มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยมะเร็งไทรอยด์ชนิด DTC มากที่สุดเมื่อเทียบกับจีโนไทป์อื่น ๆ โดยมีค่า p-value=0.017 (Swierniak et al., 2015) ใน โปแลนด์พบว่ามีความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งต่อมไทรอยด์ โดยมีค่า OR=1.14 CI=1.01-1.29 และ p-value=2.94x10<sup>-5</sup> (Liyararachchi et al., 2013) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในประชากรจีนพบว่า จีโนไทป์ TT ของ rs966423 มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็งต่อมไทรอยด์ในประชากรจีนเป็น อย่างมาก (Wei et al., 2015)

ดังนั้นการศึกษานี้ต้องการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพหุคูณฐานที่ตำแหน่ง rs966423 กับการเกิดมะเร็งไทรอยด์ชนิด DTC ในประชากรไทย เนื่องจากในประเทศไทยยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้อาจใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการทำนายโอกาสการเกิดโรคมะเร็งต่อมไทรอยด์ในประชากรไทยได้

### **วัตถุประสงค์**

เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง rs966423 และโรคมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด differentiated ในประเทศไทย

## บทที่ 2

### การตรวจเอกซเรย์ของงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### มะเร็งต่อมไทรอยด์ (Thyroid carcinoma)

มะเร็งต่อมไทรอยด์เป็นมะเร็งที่พบบ่อยมากที่สุดในมะเร็งที่เกิดในระบบต่อมไร้ท่อ จากการศึกษาผู้ป่วยมะเร็งต่อมไทรอยด์ในสหรัฐอเมริกาทั้งหมด 53,990 คนในปี 2018 พบว่าผู้ป่วย 3 ใน 4 คนเป็นเพศหญิง มะเร็งต่อมไทรอยด์พบบ่อยที่สุด 5 อันดับแรกของมะเร็งที่พบบ่อยในเพศหญิง มะเร็งต่อมไทรอยด์พบได้ทุกช่วงอายุ โดยส่วนใหญ่เพศหญิงพบในช่วง 30-65 ปี เพศชายพบมากในช่วง 65-75 ปี ซึ่งในปี 2005-2014 มะเร็งต่อมไทรอยด์ในเพศชายและหญิงมีอัตราการเพิ่มขึ้น 4 % (American Cancer Society, 2018)

มะเร็งต่อมไทรอยด์สามารถแบ่งได้ 3 ชนิดใหญ่คือ 1. Differentiated Thyroid Carcinoma (DTC) เป็นมะเร็งที่เกิดขึ้นที่เซลล์ต่อมไทรอยด์ชนิดฟอลลิคูลาร์ มะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC สามารถแบ่งย่อยได้ 2 ชนิด คือ Papillary Thyroid Carcinoma (PTC) เป็นมะเร็งต่อมไทรอยด์ที่พบบ่อยที่สุด และเป็นมะเร็งที่มีความรุนแรงน้อยที่สุดในมะเร็งต่อมไทรอยด์ มีการเจริญเติบโตของเซลล์ช้า และมีการแพร่กระจายเซลล์มะเร็งไปยังต่อมน้ำเหลือง อีกชนิดของมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC คือ Follicular Thyroid Carcinoma (FTC) เป็นมะเร็งต่อมไทรอยด์ที่พบบ่อยเป็นอันดับที่สองของมะเร็งต่อมไทรอยด์ทั้งหมด มีความรุนแรงมากกว่ามะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด PTC และเซลล์มะเร็งจะไม่แพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลือง มะเร็งชนิดนี้พบบ่อยในพื้นที่ที่ขาดธาตุไอโอดีน 2. Medullary Thyroid Carcinoma (MTC) เป็นมะเร็งที่เกิดขึ้นที่เซลล์ชนิดซีเซลล์ (C cell) ในต่อมไทรอยด์ ซึ่งทำหน้าที่สร้างฮอร์โมนแคลซิโทนิน (Calcitonin) เมื่อตรวจพบระดับแคลซิโทนินในเลือดสูงขึ้น อาจบอกได้ถึงมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิดนี้ในระยะเริ่มแรกได้ และมีแนวโน้มถึงการแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองและอวัยวะอื่น ๆ ได้ และสุดท้าย 3. Anaplastic Thyroid Carcinoma (ATC) เป็นมะเร็งต่อมไทรอยด์ที่พบได้ยาก ประมาณ 2% ของผู้ป่วยมะเร็งต่อมไทรอยด์ทั้งหมด อาจเรียกได้อีกชื่อหนึ่งคือ Undifferentiated Carcinoma เนื่องจากเซลล์มะเร็งไม่ได้มีลักษณะเหมือนเซลล์ทั่วไปในต่อมไทรอยด์ มะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิดนี้มีการแพร่กระจายอย่างรวดเร็วไปยังคอและบริเวณอื่น ๆ ของร่างกาย อีกทั้งยังมีความรุนแรงมากกว่ามะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิดอื่น ๆ รักษาได้ยาก มักพบในผู้ป่วยสูงอายุ (Nguyen et al., 2015; Clayman, 2018 : online)

มะเร็งต่อมไทรอยด์มีสาเหตุการเกิดมากมายทั้งปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ปัจจัยทางพันธุกรรมและปัจจัยอื่น ๆ ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมได้แก่ การได้รับกัมมันตภาพรังสีทั้งจากธรรมชาติและผลกระทบจากการกระทำของมนุษย์ในระดับที่สูงในบริเวณศึกระหรือล้าคอ เช่นประสบอุบัติเหตุจากโรงไฟฟ้าหรือระเบิดนิวเคลียร์ (atomic bomb) ในประเทศญี่ปุ่น การรักษาด้วยการฉายรังสี เกิดการรั่วไหลของรังสีออกมาส่งผลให้เซลล์ที่ต่อมไทรอยด์ทำงานผิดปกติไปจากเดิมทำให้กลายเป็นมะเร็งต่อมไทรอยด์ (Mustafa et al., 2017) ด้านการบริโภคอาหารเป็นปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมอย่างหนึ่งซึ่งส่งผลให้เกิดมะเร็งต่อมไทรอยด์ เช่นการได้รับสารไอโอดีน ไอโอดีนเป็นธาตุที่จำเป็นต่อการทำงานของต่อมไทรอยด์ การขาดสารไอโอดีนจะทำให้มีความเสี่ยงในการเป็น

มะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด FTC คือจะไปส่งผลกระทบต่อการทำงานของต่อมไทรอยด์ฮอร์โมนและการแสดงออกของฮอร์โมน TSH ทำให้เกิดการเจริญของเซลล์ฟอลลิคูลาร์ในต่อมไทรอยด์ ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการเจริญเป็นเซลล์มะเร็ง และการได้รับสารไอโอดีนเป็นปริมาณที่มากเกินไปจะทำให้มีความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด PTC และทำให้เซลล์มะเร็งมีการแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองมากขึ้น (Nettore, Colao, and Macchia, 2018) ปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อการเกิดมะเร็งต่อมไทรอยด์คืออายุ เนื่องจากช่วงอายุ 25-65 ปีเป็นช่วงที่เกิดมะเร็งต่อมไทรอยด์ได้มากกว่าช่วงอื่น ๆ และเพศก็มีผลต่อการเกิดมะเร็งชนิดนี้ ซึ่งมะเร็งต่อมไทรอยด์สามารถเกิดได้ทุกเพศแต่ในเพศหญิงจะมีแนวโน้มการเกิดมะเร็งต่อมไทรอยด์ได้มากกว่าเพศชาย (Asif, Ahmad, and Majid, 2015) และอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดมะเร็งต่อมไทรอยด์คือปัจจัยทางพันธุกรรม มะเร็งต่อมไทรอยด์บางชนิดอาจมีสาเหตุมาจากครอบครัวมีประวัติการเป็นโรคแล้วได้รับการถ่ายทอดมาสู่รุ่นลูก นั่นคือมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด MTC ที่มีสาเหตุมาจากการได้รับการถ่ายทอดยีนที่ผิดปกติมาจากพ่อแม่ เรียกว่า Familial Medullary Thyroid Carcinoma (FMTC) ซึ่งการเกิดมะเร็งจะพบแค่ FMTC เพียงอย่างเดียวหรือพบพร้อมการเกิดก้อนมะเร็ง ซึ่งการพบทั้งสองอย่างนี้เรียกว่า Multiple Endocrine Neoplasia type 2 (MEN 2) โดย MEN2 แบ่งได้ 2 ชนิดคือ MEN 2a และ MEN 2b ทั้งสองชนิดเกิดจากการมิวเทชันของยีน *RET* (Elisei et al., 2013) สาเหตุทางพันธุกรรมยังอาจเกิดจากการมิวเทชันของยีนอื่นที่ส่งผลให้เกิดมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิดอื่นอีก ทั้งการมิวเทชันของเซลล์ร่างกาย (somatic mutation) และการมิวเทชันของเซลล์สืบพันธุ์ (germline mutation) (Rebai and Rebai, 2016)

### Somatic mutation

Somatic mutation คือมิวเทชันที่เกิดในเซลล์ร่างกาย ซึ่งการเกิดมิวเทชันแบบนี้จะไม่มีการถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูกหลาน การแสดงออกของเซลล์ที่เกิดมิวเทชันจึงมีการแสดงออกในบริเวณจำเพาะ เช่น ปอด ผิวหนัง ตับ และเนื้อเยื่ออื่น ๆ เป็นต้น สาเหตุการเกิด somatic mutation ส่วนใหญ่เกิดจากปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม เช่น การได้รับแสง UV การได้รับกัมมันตภาพรังสี และการรับสารเคมีอันตราย เป็นต้น (Chavan, 2018 : online) การศึกษาความผิดปกติแบบ somatic mutation ในผู้ป่วยมะเร็งต่อมไทรอยด์ จะศึกษาที่ก้อนมะเร็งต่อมไทรอยด์ซึ่งเป็นการตรวจวิเคราะห์เพื่อยืนยันการเกิดโรค การวางแผนการรักษา ตลอดจนการพยากรณ์โรค โดยยีนที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งต่อมไทรอยด์ได้แก่ ยีน *BRAF* เป็นยีนที่สร้างโปรตีน B-raf ที่ช่วยในการส่งสารเคมีจากนอกเซลล์เข้าสู่เซลล์ในกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการเจริญและการแบ่งเซลล์ มิวเทชันบนยีน *BRAF* ตำแหน่ง c.1799A>T (p.V600E) พบมากในผู้ป่วยมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด PTC (Yoon et al., 2015) ยีน *RAS* จะสร้างโปรตีน RAS (KRAS, NRAS, HRAS) ทำหน้าเป็นสวิตช์เปิด-ปิดระหว่างรูปแบบ GTP-bound ทำงานและรูปแบบ GDP-bound ไม่ทำงานซึ่งจะควบคุมเครือข่ายสัญญาณภายในเซลล์ไปควบคุมการเจริญ การเปลี่ยนแปลงและการอยู่รอดของเซลล์ มิวเทชันของยีน *RAS* จะไปทำให้มีการสร้าง GTP เพิ่มขึ้น (โคดอนที่ 12 และ 13) หรือมีผลยับยั้งการทำงานของ GTPase (โคดอนที่ 61) มิวเทชันของยีน *RAS* พบมากเป็นอันดับสองของ

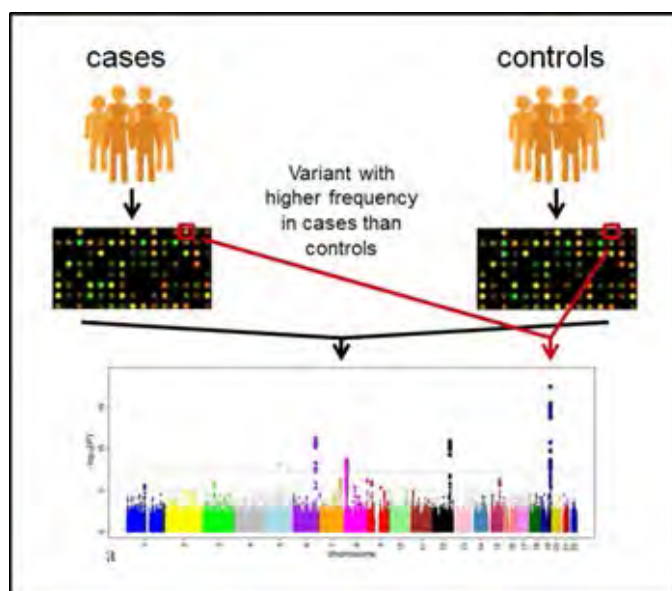
ผู้ป่วยมะเร็งต่อมไทรอยด์รองจากยีน *BRAF* (Howell, Hodak, and Yip, 2013) ยีน *RET/PTC* เป็นยีนที่จะผลิตโปรตีนที่ทำหน้าที่ส่งสัญญาณภายในเซลล์ มีวเทชันของยีน *RET/PTC* มีหลายรูปแบบที่พบบ่อยคือ *RET/PTC1* (*inv(10)(q11.2;q21)*) และ *RET/PTC3* (*inv(10)(q11.2;q10)*) ซึ่งการได้รับรังสีมีส่วนทำให้เกิดวเทชันของ *RET/PTC* ยีนที่ได้กล่าวไปทั้ง 3 ยีนนี้เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับ mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling pathway ซึ่งเป็นกระบวนการแปลงสัญญาณภายในเซลล์เพื่อรักษาการทำงานของเซลล์ เช่น การเจริญของเซลล์และการตายของเซลล์ โดยจะตอบสนองต่อ receptor tyrosine kinase (RTK) บนผิวเซลล์ (Tang and Lee, 2010) นอกจากนี้ยังมียีนอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งต่อมไทรอยด์คือยีน *Telomerase reverse transcriptase (TERT)* เป็นยีนที่ทำหน้าที่สร้างองค์ประกอบของเอนไซม์เทโลเมอเรส (Telomerase) มีวเทชันบนยีน *TERT* เกิดบริเวณ promoter ตำแหน่ง 1,295,228C>T (C228T) และ 1,295,250C>T (C250T) โดย C228T จะพบได้มากกว่า C250T ในผู้ป่วยมะเร็งต่อมไทรอยด์ ผลการเกิดวเทชันนี้จะไปกระตุ้นให้ E-twenty-six (ETS) transcription factors จับที่ตำแหน่ง TERT promoter มากทำให้เกิด transcription มาก (Liu and Xing, 2016) ยีน *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha (PIK3CA)* ทำหน้าที่สร้างโปรตีน p110 alpha (*p110 $\alpha$* ) ซึ่งเป็น subunit หนึ่งของเอนไซม์ phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) ซึ่งโปรตีนนี้จะทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ยีน *PIK3CA* เกิดวเทชันในตำแหน่ง p.H1047R ซึ่งสามารถกระตุ้นให้มะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด PTC พัฒนาไปเป็นชนิด ATC ได้ (Roelli et al., 2017)

### Germline mutation

Germline mutation คือการเกิดวเทชันในเซลล์สืบพันธุ์ ซึ่งการเกิดวเทชันแบบนี้จะมีการถ่ายทอดจากพ่อแม่ไปสู่ลูกหลานหากเซลล์สืบพันธุ์ถูกวเทชันไป จะสามารถพบวเทชันได้ในทุกเซลล์ของร่างกาย จึงสามารถนำเนื้อเยื่อมาศึกษาได้ทุกเนื้อเยื่อในร่างกาย โดยส่วนใหญ่จะใช้เลือดในการตรวจเนื่องจากสามารถเก็บตัวอย่างเซลล์ได้ง่าย การศึกษา germline mutation สามารถใช้ทำนายความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งต่อมไทรอยด์ได้ เรียกว่า genetic predisposition หรือ genetic susceptibility กล่าวคือเมื่อเกิดความผิดปกติบนยีนแล้วมีความสัมพันธ์กับการเกิดของโรคแต่อาจไม่ได้เป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรค ในการศึกษา germline mutation จะพบตำแหน่งที่เกิดวเทชันภายในจีโนมมากมาย ซึ่งมีความสัมพันธ์กับลักษณะทางพันธุกรรมบางอย่างเช่น การจัดเรียงตัวของโครโมโซม ระดับการแสดงออกของยีน การจับของ transcription factor และอื่น ๆ อีกมากมาย (Pich et al., 2018) การศึกษาตำแหน่งของพหุสัณฐาน (Single nucleotide polymorphism, SNP) เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา germline mutation โดย SNP เป็นการแปรผันของลำดับดีเอ็นเอรูปแบบหนึ่ง คือจะมีลำดับนิวคลีโอไทด์เปลี่ยนแปลงไปหนึ่งตำแหน่งทำให้มีความแตกต่างกันในแต่ละบุคคล SNP อาจเป็นตำแหน่งที่อยู่ในบริเวณที่เป็นยีนหรือไม่ใช่ยีน (Lister Hill National Center for Biomedical Communications, 2019 : online)



การศึกษา SNP ส่วนใหญ่จะศึกษาโดยการทำ GWAS (Saenko and Rogounovitch, 2018) โดย GWAS เป็นวิธีการในการหาตำแหน่งของ SNPs ทุกโครโมโซมที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ต้องการศึกษาโดยทำการเปรียบเทียบระหว่างผู้ที่มีลักษณะที่ต้องการศึกษากับผู้ที่ไม่มีลักษณะที่ต้องการศึกษา หากศึกษามะเร็งต่อมไทรอยด์จะศึกษาในผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งต่อมไทรอยด์ เปรียบเทียบกับคนปกติที่ไม่มีประวัติเป็นโรคเกี่ยวกับมะเร็งต่อมไทรอยด์ โดยเปรียบเทียบความแตกต่างของ SNP ในผู้ป่วยและคนปกติเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่าง SNP กับลักษณะที่ต้องการศึกษา วิเคราะห์ผลในรูปของสถิติคือค่า P-value, odd ratio และ 95% confidence interval ดังรูปที่ 2.1 ผลการศึกษาจะเป็นรูปของการเรียงแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ติดกับ probe โดย probe จะเป็นดีเอ็นเอสายสั้นมีลำดับเบสที่ตรงข้ามกับลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษา ซึ่งบ่งบอกถึง SNP ตำแหน่งนั้นมีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของยีนส่งผลกระทบต่อการแสดงออกของลักษณะที่ต้องการศึกษา หากคนปกติไม่มีการแสดงออกแต่ผู้ป่วยแสดงออกจะหมายความว่าตำแหน่งดังกล่าวเกี่ยวข้องกับการเกิดโรค และผลยังสามารถวิเคราะห์ให้อยู่ในรูปของกราฟ Manhattan plot ระหว่าง  $-\log(P\text{-value})$  กับตำแหน่ง บนโครโมโซมต่าง ๆ หาก  $-\log(P\text{-value})$  มีค่ามากแสดงถึงมีการแสดงออกในตำแหน่งนั้นมากทำให้สามารถสรุปได้ว่าตำแหน่งดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ต้องการศึกษา (Sud, Kinnersley and Houlston, 2017)



**รูปที่ 2.1** ผลการศึกษา Genome-Wide Association Study (GWAS)  
(European Bioinformatics Institute, 2018 : online)

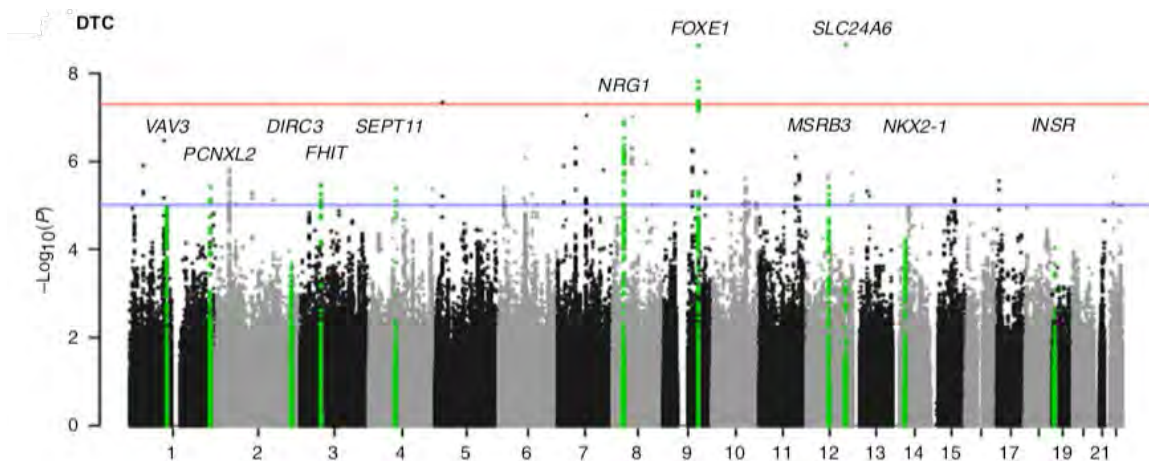
จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า มี SNPs ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งต่อมไทรอยด์จำนวนมาก ในตารางที่ 2.1 เป็นตัวอย่าง SNPs เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งต่อมไทรอยด์ที่ได้มีการศึกษาไว้ เช่น rs965513 rs944289 rs2439302 rs966423 rs1693425 rs861539 rs1799782 rs1136410 rs180414 rs9952940 และ rs3780873 เป็นต้น

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่าง SNPs เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งต่อมไทรอยด์

SNP	ยีน	หน้าที่
rs965513	<i>forkhead factor E1 (FOXE1)</i> ตำแหน่ง 9q22.33	- สร้างโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็น transcription factor ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของต่อมไทรอยด์ (Wang et al., 2016) - เป็นศูนย์กลางของการผลิตฮอร์โมนไทรอยด์และควบคุมการหลั่งฮอร์โมน TSH
rs944289	<i>NKX2 homeobox 1 (NKX2-1)</i> ตำแหน่ง 14q13.3	ทำหน้าที่ในการส่งสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของต่อมไทรอยด์ (Pereda et al., 2015)
rs2439302	<i>neuregulin 1 (NRG1)</i> บริเวณ intron ตำแหน่ง 8p12	สร้างไกลโคโปรตีนที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ มีบทบาทสำคัญในการเจริญเติบโตและพัฒนาาระบบอวัยวะ
rs966423	<i>disrupted in renal carcinoma 3 (DIRC3)</i> บริเวณ intron ตำแหน่ง 2q35	-
rs1693425	<i>solute carrier family 8 member B1 (SLC24A6)</i> บริเวณ 3'-UTR ตำแหน่ง 12q24.13	เกี่ยวข้องกับการแลกเปลี่ยนโซเดียม-แคลเซียมที่มีการใช้ธาตุโพแทสเซียม
rs861539 rs1799782	ยีน <i>X-ray repair cross complementing 1 (XRCC1)</i> ตำแหน่ง	เกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เกิดจากการได้รับรังสีไอออไนซ์และสารอัลคาไลน์ (Zhu, Qi, and Li, 2018)

SNP	ยีน	หน้าที่
rs1136410 rs180414	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP1)</i>	มีหน้าที่ในกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอ (Bashir et al., 2018)
rs9952940	<i>erythrocyte membrane protein band 4.1 like 3 (EPB41L3)</i> บริเวณ intron	สร้างโปรตีน EPB41L3 ที่มีความสัมพันธ์กับโปรตีน YWH และการยึดติดกันของเซลล์
rs3780873	<i>Integrin beta-1 (ITGB1)</i> บริเวณ intron	สร้างโปรตีนที่เป็น membrane receptor ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการยึดติดกันของเซลล์และการรับรู้ในกระบวนการต่างๆ เช่น embryogenesis hemostasis การซ่อมแซมเนื้อเยื่อและการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกัน (Hwangbo et al. 2018)

นอกจากนี้ยังมี SNPs อีกมากมายที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งต่อมไทรอยด์ ยกตัวอย่าง ผลการศึกษา GWAS ที่มียีนอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งต่อมไทรอยด์ ดังรูปที่ 2.2 กราฟ Manhattan plot เป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง  $-\log(P\text{-value})$  กับตำแหน่งโครโมโซม จากการทำให้ GWAS ในผู้ป่วยมะเร็งต่อมไทรอยด์เปรียบเทียบกับคนปกติ โดยจุดที่เกิดขึ้นคือตำแหน่งที่มีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะการเกิดมะเร็งต่อมไทรอยด์ โดยตำแหน่งที่จะสรุปได้ว่ามีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งต่อมไทรอยด์คือตำแหน่งที่มีค่า P-value น้อยกว่า 0.05 ซึ่งเมื่อเทียบกับกราฟคือจะต้องมีจุดที่เกินจากค่า  $-\log(P\text{-value})$  เท่ากับ 5 จึงสรุปได้ว่าตำแหน่งดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งต่อมไทรอยด์



รูปที่ 2.1 Manhattan plot ของยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC จากการทำ GWAS (Ho et al., 2017)

#### rs966423

rs966423 เป็น SNP ที่อยู่ในบริเวณ intron 3 ของยีน *DIRC3* ตำแหน่ง 2q35 เป็นตำแหน่ง CTCF protein-binding site ซึ่ง CTCF จะเกี่ยวข้องกับ transcriptional activation/repression, enhancer blocking, gene insulation, gene silencing และ genomic imprinting การเกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของ rs966423 จะส่งผลให้ลดการทำงานของ CTCF (Wang et al., 2013) อีกทั้ง rs966423 ยังมีผลกับการแสดงออกของยีน *heat shock protein beta-1 (HSPB1)* เป็นยีนที่สร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการช่วยปกป้องเซลล์จากสภาวะแวดล้อมที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ เช่น การถูกบุกรุกหรือได้รับสารพิษต่าง ๆ และมีส่วนในการรวมตัวกันของ *DIRC3-HSPBAP1* (Wen et al., 2015) ตำแหน่ง rs966423 มีเบสได้ 2 แบบคือเบส C และเบส T ในคนปกติส่วนใหญ่ ตำแหน่งนี้จะมียีนไทป์แบบ CC และ CT ซึ่งในคนยุโรปและอเมริกาจะมีความถี่แอลลีล C เท่ากับ 0.6 และมีความถี่แอลลีล T เท่ากับ 0.4 ส่วนในคนเอเชียจะมีความถี่แอลลีล C เท่ากับ 0.7 และมีความถี่แอลลีล T เท่ากับ 0.3 (1000Genomes, 2018 : online) จากการศึกษากว่า GWAS ในประชากรประเทศสหรัฐอเมริกา โดยศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง rs965513 rs944286 rs116909374 rs2439302 และ rs966423 กับการเกิดมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด PTC พบว่า SNPs ทั้ง 5 ตำแหน่ง มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด PTC ในประชากรสหรัฐอเมริกาโดย rs966423 มีค่า  $OR=1.27$  ( $95\%CI=1.14-1.42$ ,  $p\text{-value}=2.18 \times 10^{-5}$ ) และมีการศึกษาพบว่า rs966423 มีความสัมพันธ์กับระดับการลดลงของฮอร์โมน thyroid stimulating hormone (TSH) ในผู้ป่วยมะเร็งต่อมไทรอยด์และยังพบว่าจีโนไทป์ TT จะส่งผลให้มีการเพิ่มขึ้นของอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC มากที่สุดเมื่อเทียบกับจีโนไทป์อื่น ๆ โดยมีค่า  $p\text{-Value}=0.017$  และมีการศึกษา rs966423 ว่ามีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งต่อมไทรอยด์ในกลุ่มประชากรอีกหลายประเทศ ได้แก่ ประชากรโปแลนด์พบว่ามีความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งต่อมไทรอยด์ โดยมีค่า  $OR=1.14$  ( $95\%CI=1.01-1.29$ ,  $p\text{-Value}=2.94 \times 10^{-2}$ ) สอดคล้องกับประชากรไอซ์แลนด์

เนเธอร์แลนด์ และสเปน นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในประชากรจีนพบว่า rs966423 มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็งต่อมไทรอยด์ในประชากรจีนและเกาหลี การศึกษา rs966423 ในจีนเอเชียมีการศึกษาแค่ในประเทศจีนและเกาหลี ประเทศอื่น ๆ ในทวีปเอเชียยังไม่ค่อยมีการศึกษาดำเนินการนี้รวมไปถึงการศึกษาในประเทศไทย

## PCR-RFLP

SNPs เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนแปลงไปหนึ่งตำแหน่ง มีเบสที่แตกต่างกันในแต่ละบุคคล ดังนั้นการศึกษา SNPs จึงใช้การตรวจสอบหาลำดับนิวคลีโอไทด์ หรือ genotyping เป็นหลัก การศึกษา genotyping สามารถทำได้หลายวิธี Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) ก็เป็นวิธีการศึกษา genotyping รูปแบบหนึ่งที่ได้รับยอมรับและเป็นที่ยอมรับมาก โดย PCR คือการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยการจำลองกระบวนการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอ (DNA replication) และ RFLP คือการนำเอนไซม์ตัดจำเพาะมาใช้ในตัดสายดีเอ็นเอ โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะจะจดจำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่จะตัดอย่างจำเพาะ ดังนั้น PCR-RFLP จึงเป็นการนำเอนไซม์ตัดจำเพาะมาใช้ในการแยกแยะลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน การใช้วิธีนี้จะต้องทราบถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตที่จะนำมาศึกษาของ SNPs เพื่อใช้คัดเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถแยกแยะ SNPs นั้น ๆ ได้ ทั้งนี้การตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะสามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Rasmussen, 2012)

### บทที่ 3

## วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินงาน

#### ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาเป็นตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด differentiated ที่ได้รับมาจากโรงพยาบาลศิริราช ซึ่งเป็นตัวอย่างเลือดที่ได้รับการอนุมัติจาก คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล และตัวอย่างเลือดกลุ่มควบคุมได้รับจากอาสาสมัครที่เป็นคนปกติที่ไม่มีประวัติเป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับต่อมไทรอยด์

#### วัสดุอุปกรณ์

- Micropipette (Gillson, USA)
- Pipette tip (Thermo Scientific, USA)
- Beaker
- Flask
- Rack
- Vortex machine (FinePCR, Korea)
- Centrifuge (Hettich, Singapore)
- Electrophoresis chamber set (Cosmobio, Japan)
- Electrophoresis power supply (Cosmobio, Japan)
- Gel documentation analysis set (Bio-Rad, USA)
- Thermal cycle machine (Bioer Gene Pro, China)
- Spectrophotometer (SpectraMax, USA)
- Water bath (Major Science, USA)

#### สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้สกัดดีเอ็นเอ
  - Blood/Cell DNA Mini Kit (Geneaid Biotech Ltd, New Taipei city, Taiwan)
2. สารเคมีที่ใช้ในการทำพีซีอาร์
  - น้ำกลั่น (Thermo Scientific, USA)
  - 10X PCR Buffer ((Thermo Scientific, USA)
  - 25 mM MgCl<sub>2</sub> (Thermo Scientific, USA)
  - 10 μM dNTP (Thermo Scientific, USA)
  - 10 μM primer (Thermo Scientific, USA)

Forward primer: 5'- CCCACGTGGAGAGGTGAGAAAAGTAGGGTGGGAAGAGGACA -3'

Reverse primer: 5'- TCTGTCTGTGCTCCAAGGTG- -3'

- Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific, USA)

3. สารเคมีที่ใช้สำหรับการทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

- น้ำกลั่น
- Tris base (Vivantis, Malaysia)
- boric acid (Vivantis, Malaysia)
- EDTA (Vivantis, Malaysia)
- Agarose gel (Vivantis, Malaysia)
- 6X DNA loading dye
- 100bp DNA ladder (Thermo Scientific, USA)

4. สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบผลเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

- Ethidium bromide (Thermo Scientific, USA)
- Safe View DNA Stain (ABM, Canada)
- SMOBIO Nucleic Acid Gel Stain (Smobio, Taiwan)

5. สารเคมีที่ใช้ในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

- น้ำกลั่น
- Restriction enzyme: *Nla*III (Biolab inc., USA)
- 10X NEB buffer Cutsmart® (Biolab inc., USA)

## วิธีการดำเนินงาน

### การรวบรวมตัวอย่าง

รวบรวมตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC จากโรงพยาบาลศิริราช ซึ่งได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล และรวบรวมตัวอย่างคนปกติจากกลุ่มอาสาที่ไม่มีประวัติเป็นโรคเกี่ยวกับต่อมไทรอยด์ รวมถึงครอบครัวต้องไม่มีประวัติการเป็นโรคเกี่ยวกับต่อมไทรอยด์โดยได้รับตัวอย่างเลือดผู้ป่วยมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC จำนวน 239 ตัวอย่างและตัวอย่างเลือดของกลุ่มควบคุมจำนวน 179 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างเลือดจะเก็บในหลอด EDTA blood tube ปริมาณ 3 ml และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

### การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดโดยใช้ Blood/Cell DNA Mini Kit (Geneaid Biotech Ltd, Taiwan) วัดค่าการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรและ 280 นาโนเมตร เทียบเป็นสัดส่วนค่าการดูดกลืนแสง  $OD_{260}/OD_{280}$  โดยดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์ต้องมีค่า  $OD_{260}/OD_{280}$  มากกว่า 1.8 และบันทึกค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอเก็บดีเอ็นเอในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ในตู้เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เจือจางดีเอ็นเอให้มีเข้มข้นเท่ากับ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ในหลอดขนาด 0.6 มิลลิลิตร (Chacon-Cortes and Griffiths, 2014)

### การออกแบบไพรเมอร์สำหรับกระบวนการพีซีอาร์

การออกแบบไพรเมอร์จะใช้โปรแกรม Primer 3 (<http://primer3.ut.ee>) ในการออกแบบ โดยจะนำลำดับเบสที่มีตำแหน่งของ rs966423 ที่ได้จากฐานข้อมูล NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ซึ่งจะออกแบบไพรเมอร์ให้ครอบคลุมบริเวณตำแหน่ง rs966423

### การเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะ

การเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะจะใช้โปรแกรม NEB cutter 2.0 (Biolab, USA) โดยศึกษาจากผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการออกแบบไพรเมอร์ ซึ่งเปรียบเทียบกันระหว่างตำแหน่งของ SNP rs966423 ที่มีเบส C และเบส T เลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ให้ผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่างกัน

### การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยกระบวนการพีซีอาร์

ปริมาณสุทธิของสารที่ใช้ในกระบวนการพีซีอาร์สำหรับ 1 Master Mix มีปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยสารดังตารางที่ 3.1 ขั้นตอนในกระบวนการพีซีอาร์ประกอบไปด้วย Denature Annealing (หาอุณหภูมิในขั้นตอนนี้จากการทำ gradient PCR) และ Extension โดยมีจำนวน thermocycle ทั้งหมด จำนวน 35 รอบ ในการทำ gradient PCR จะใช้สัดส่วนของ Master



Mix ดังที่กล่าวไปและปรับเปลี่ยนให้เหมาะสมกับการทดลองในงานวิจัยนี้ เมื่อได้ปริมาณสารและอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทดลองแล้ว จึงจะทดลองทำพีซีอาร์กับตัวอย่างจริงที่ใช้ในงานวิจัย

**ตารางที่ 3.1** ปริมาณสารในกระบวนการพีซีอาร์สำหรับ 1 ตัวอย่างการทดลอง

	ความเข้มข้น	ปริมาตร (µL)
น้ำกลั่น	-	14.7
10X PCR Buffer	1X	2
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1.5 mM	1.2
10 mM dNTP	0.2 µM	0.4
10 µM forward primer	0.15 µM	0.3
10 µM reverse primer	0.15 µM	0.3
5 U/mL <i>Taq</i> DNA polymerase	0.5 U	0.1
gDNA	50 ng	1
Total		20

ตรวจสอบผลการทำพีซีอาร์ด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ agarose gel ความเข้มข้น 1.5% (w/v) ในการตรวจสอบ โดยมี ExelBrand™ 100 bp DNA ladder เป็น DNA marker เทียบขนาดของ PCR products และใช้ Electrophoresis power supply ที่มีกำลังไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ย้อมสีเจลด้วย Safe view DNA stain หรือ SMOBIO nucleic acid gel stain ตรวจสอบผลโดย gel documentation analysis ทำการบันทึกภาพและเก็บข้อมูล

#### การตัด PCR product ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำ PCR products บ่มกับเอนไซม์ตัดจำเพาะที่คัดเลือกไว้ใน 1X buffer ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ตรวจสอบด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสใน agarose gel ความเข้มข้น 2.5 % (w/v) โดยมี 100 bp DNA ladder เป็น DNA marker ที่ใช้ในการเทียบขนาดของ PCR products และใช้ Electrophoresis power supply ที่มีกำลังไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที ย้อมสีเจลด้วย ethidium bromide เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างน้ำเป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบผลโดย gel documentation analysis ทำการบันทึกภาพและเก็บข้อมูล

#### การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR product ด้วยการส่ง DNA Sequencing (Macrogen, Korea) โดยสุ่มตัวอย่างทั้งหมดจากผู้ป่วยและคนปกติ จีโนไทป์ละ 3 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 9 ตัวอย่างเพื่อตรวจสอบความจำเพาะของพีซีอาร์

### การวิเคราะห์ผลการทดลองและคำนวณค่าทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ โดยวิเคราะห์ Hardy-Weinberg Equilibrium และเปรียบเทียบ SNP ในกลุ่มผู้ป่วยและคนปกติด้วย Pearson Chi-square test โดยใช้โปรแกรม SPSS (An IBM company, USA) และวิเคราะห์ผลการทดลองในรูปของค่า P-value Odds ratio และ 95% Confidence interval (95% CI)

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### การรวบรวมตัวอย่าง

ตัวอย่างเลือดผู้ป่วยมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC จำนวน 239 ตัวอย่างและตัวอย่างเลือดของกลุ่มควบคุมจำนวน 179 ตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่างทั้งในเพศชายและเพศหญิงช่วงอายุประมาณ 20-90 ปี ตัวอย่างเพศชายกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC 46 ตัวอย่างและกลุ่มควบคุม 40 ตัวอย่าง เพศหญิงกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC 193 ตัวอย่างและกลุ่มควบคุม 139 ตัวอย่าง โดยในตัวอย่างผู้ป่วยและตัวอย่างกลุ่มควบคุมมีอายุเฉลี่ย 51 ปี และ 31 ปี ตามลำดับ

#### การสกัดดีเอ็นเอ

หลังจากสกัดดีเอ็นเอจึงนำดีเอ็นเอมาวัดกับเครื่อง spectrophotometer พบว่าดีเอ็นเอมีค่าการดูดกลืนแสง  $OD_{260}/OD_{280}$  อยู่ในช่วง 1.6-1.9 ซึ่งถือว่ามีความบริสุทธิ์ ดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นมากกว่า 80 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรจะเจือจางความเข้มข้นเป็น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

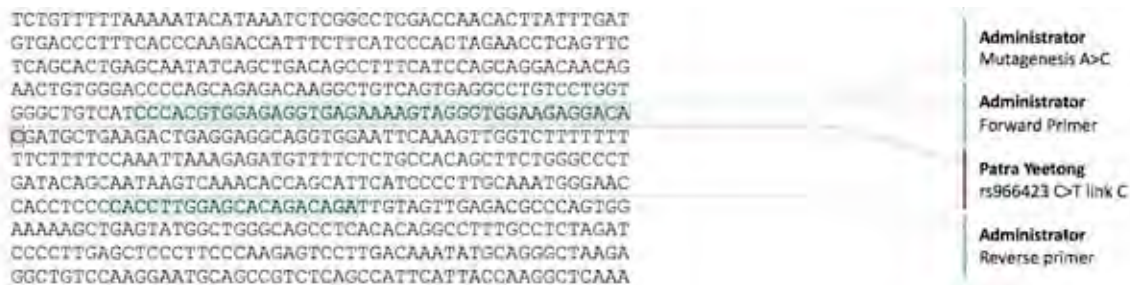
#### การออกแบบไพรเมอร์

ไพรเมอร์ที่ได้จากการออกแบบโดยใช้โปรแกรม Primer 3 ไม่มีตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่จดจำได้ จึงทำการออกแบบไพรเมอร์ใหม่ด้วยตนเอง โดยการออกแบบไพรเมอร์จะออกแบบ forward primer ให้ใกล้กับบริเวณของ SNP เพื่อทำการเปลี่ยนเบส A เป็นเบส C ซึ่งจะได้ PCR product ที่มีเอนไซม์ตัดจำเพาะสามารถจดจำลำดับเบสได้ โดยจะได้ไพรเมอร์ดังนี้

Forward Primer: 5'- CCCACGTGGAGAGGTGAGAAAAGTAGGGTGAAGAGGAC A-3'

Reverse Primer: 5'- TCTGTCTGTGCTCCAAGGTG -3'

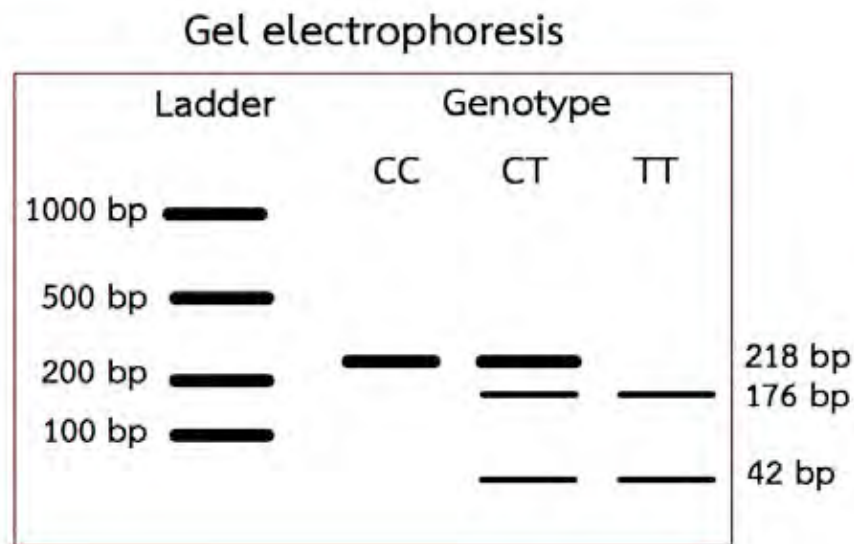
ซึ่งจะให้ PCR product 218 bp ดังรูปที่ 4.1 เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *DIRC3* บริเวณ intron 3 ซึ่งมีเบสของ rs966423 และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ที่ทำการออกแบบ



รูปที่ 4.1 ลำดับเบสที่มีตำแหน่ง rs966423 และลำดับเบสที่ใช้เป็นไพรเมอร์

### การออกแบบเอนไซม์ตัดจำเพาะ

เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ออกแบบได้คือ *NlaIII* จดจำลำดับเบสที่เป็น 5' CATG 3' ซึ่งจะมีผลการตัดดังรูปที่ 4.2 เป็นแผนภาพจำลองการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NlaIII* จากโปรแกรม NEB cutter 2.0 rs966423 ที่มีเบส T คือมีลำดับเบสเป็น 5' CATG 3' เอนไซม์ตัดจำเพาะ *NlaIII* ตัดสายดีเอ็นเอได้ผลเป็น 176 bp และ 42 bp แต่ rs966423 ที่มีเบส C คือมีลำดับเบสเป็น 5' CACG 3' เอนไซม์ตัดจำเพาะ *NlaIII* ไม่ตัดสายดีเอ็นเอได้ผลเป็น 218 bp



**รูปที่ 4.2** แผนภาพจำลองผลการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NlaIII* จากโปรแกรม NEB cutter 2.0 (ladder ขนาด 1000 500 200 และ 100 bp จากบนลงล่าง จีโนไทป์ของ rs66423 คือ CC CT และ TT) จีโนไทป์ CC จะพบ 1 แถบขนาด 218 bp จีโนไทป์ CT พบ 3 แถบขนาด 218 bp 176 bp และ 42 bp ตามลำดับและจีโนไทป์ TT พบ 2 แถบขนาด 176 bp และ 42 bp

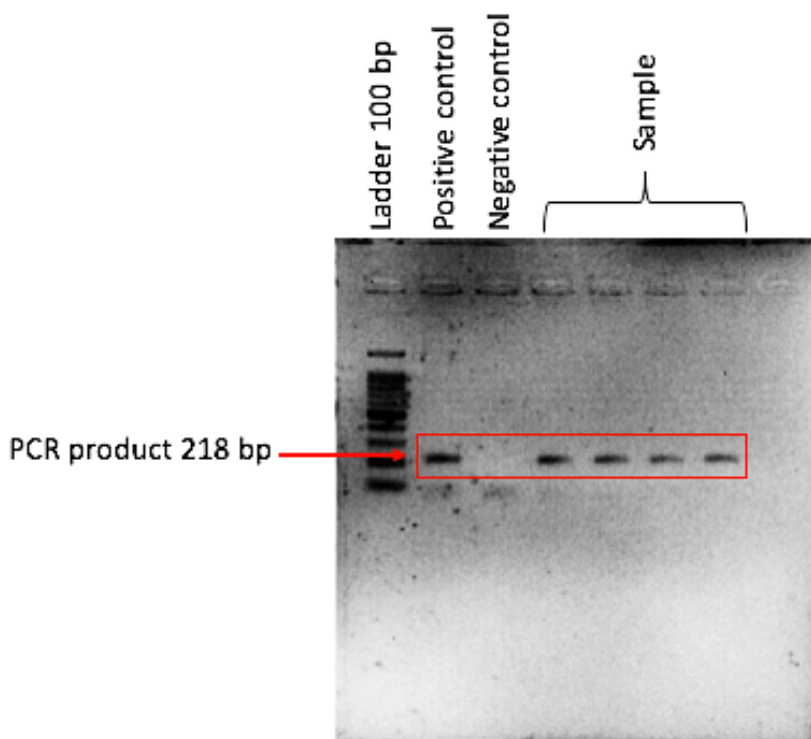
### การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยกระบวนการพีซีอาร์

จากการทำ gradient PCR ได้อุณหภูมิที่เหมาะสมดังตารางที่ 4.1 คือขั้น Pre-denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ขั้น Denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ขั้น Annealing ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ขั้น Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที และขั้น Final-extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

ตารางที่ 4.1 ขั้นตอนในกระบวนการพีซีอาร์

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
Pre-denature	94	5 นาที
Denature	94	30 วินาที
Annealing	56	30 วินาที
Extension	72	45 วินาที
Final extension	72	10 นาที
Hold	4	-

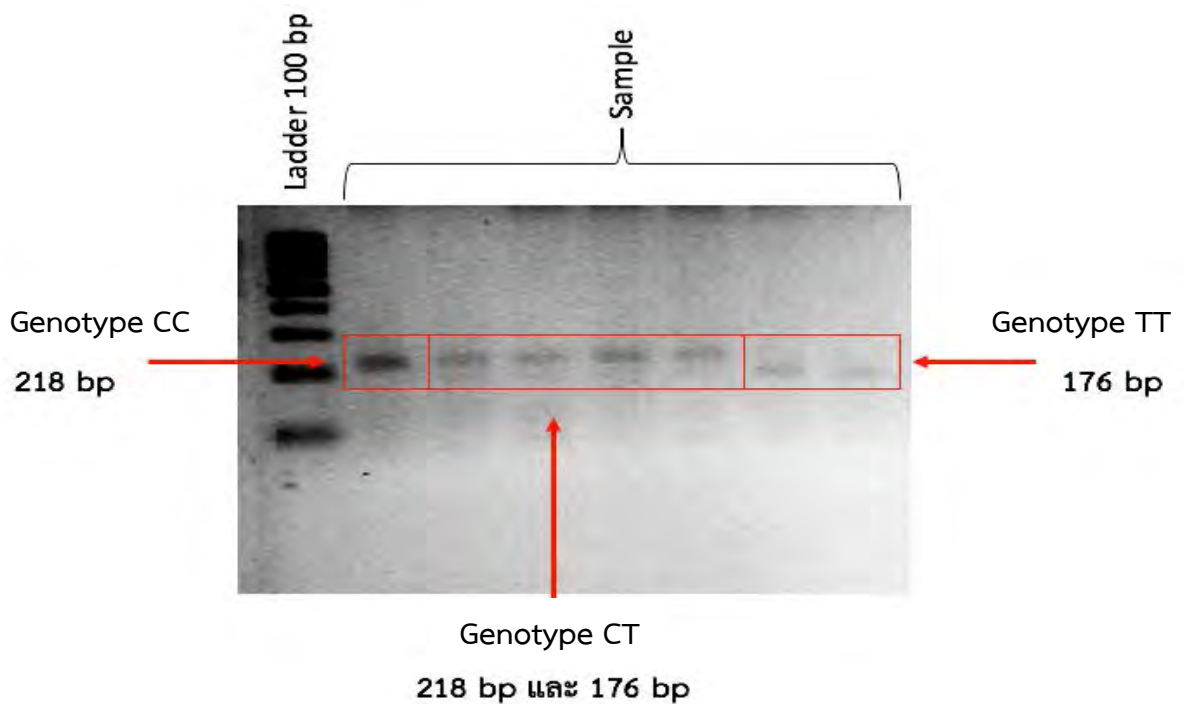
การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณที่มีตำแหน่ง rs966423 ด้วยกระบวนการพีซีอาร์และตรวจสอบขนาดของ PCR products ด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสจะได้ดีเอ็นเอที่มีขนาด 218 bp ดังรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 . ผลเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของการตรวจสอบผลของการทำ PCR (ladder 100-1000 bp จากล่างขึ้นบน Positive control แทน DNA control Negative control แทนน้ำกลั่น และ Sample แทนตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง)

### การตรวจสอบผลการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

เอนไซม์ตัดจำเพาะจะจดจำตำแหน่งที่ศึกษามีลำดับเบสเป็น T และจะไม่มีผลตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะเมื่อตำแหน่งที่ศึกษามีลำดับเบสเป็น C จึงเกิดความแตกต่างของขนาด PCR products ผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจะพบจีโนไทป์ CC มีแถบดีเอ็นเอขนาด 218 bp จีโนไทป์ CT ขนาด 218 bp และ 176 bp และจีโนไทป์ TT ขนาด 176 bp ซึ่งไม่พบแถบดีเอ็นเอที่ขนาด 42 bp ในการทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเนื่องจาก ดีเอ็นเอขนาด 42 bp มีขนาดเล็กเมื่อใช้ agarose gel จึงไม่พบแถบดีเอ็นเอดังรูปที่ 4.4



**รูปที่ 4.4** ผลเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของการตรวจสอบผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NlaIII* (ladder 100-1000 bp จากล่างขึ้นบน Sample แทนตัวอย่างที่นำมาศึกษา)

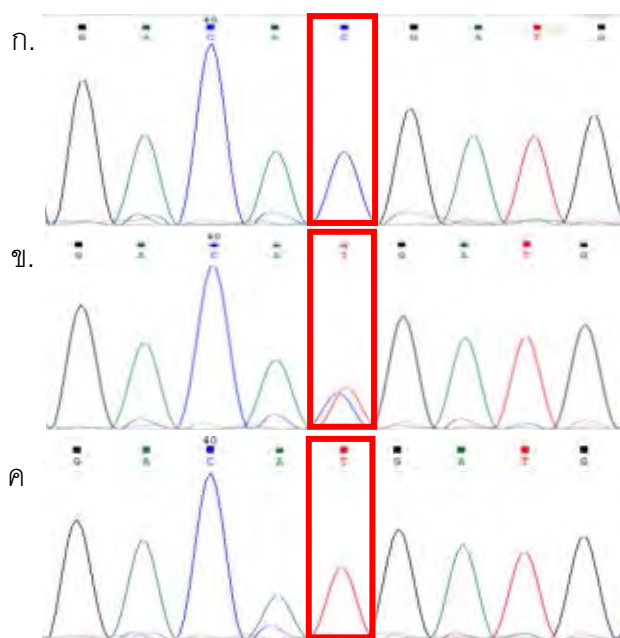
จากการทำการทดลองพบจีโนไทป์ที่ได้จากการทดลองโดยการทำให้ PCR-RFLP ทั้งหมด 418 ตัวอย่าง ไม่สามารถเก็บผลการทดลองได้ 17 ตัวอย่าง และได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.2 กลุ่มควบคุม 178 ตัวอย่าง พบจีโนไทป์ CC 130 ตัวอย่าง จีโนไทป์ CT 45 ตัวอย่างและจีโนไทป์ TT 3 ตัวอย่าง กลุ่มผู้ป่วยมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC 223 ตัวอย่าง พบจีโนไทป์ CC 178 ตัวอย่าง จีโนไทป์ CT 44 ตัวอย่างและจีโนไทป์ TT 1 ตัวอย่าง

ตารางที่ 4.2 จีโนไทป์ที่พบในตัวอย่างที่ทำการศึกษาทดลอง

Genotype	Controls	DTC patients
CC	130	178
CT	45	44
TT	3	1
รวม	178	223

### การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

จากผลการส่ง sequencing เพื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้ผลดังรูปที่ 4.5 ตำแหน่งของ rs966423 เป็นลำดับเบสที่ 42 ของ PCR product จีโนไทป์ CC พบพีคของแอลลีล C (สีน้ำเงิน) จำนวน 1 พีค จีโนไทป์ CT พบพีคของแอลลีล C และแอลลีล T (สีแดง) จำนวน 2 พีค ซ้อนทับกันและจีโนไทป์ TT พบพีคของแอลลีล T จำนวน 1 พีค



รูปที่ 4.5 DNA sequencing ของ ก. allele CC, ข. allele CT และ ค. allele TT

### การวิเคราะห์ผลการทดลองและคำนวณค่าทางสถิติ

จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติผลการศึกษาค่าความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของ rs966423 กับมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC ในประชากรไทยจำนวน 401 คน การวิเคราะห์ Hardy-Weinberg Equilibrium พบว่ามีค่า P-value มากกว่า 0.05 จึงสามารถสรุปได้ว่าอยู่ในสมดุลของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก โดยมีค่าความถี่แอลลีล C เท่ากับ 0.88 ความถี่แอลลีล T เท่ากับ 0.12 และการวิเคราะห์ค่าทางสถิติของจีโนไทป์ทั้งหมดของ rs966423 พบว่ามีค่าดังตารางที่ 4.3 ซึ่งเป็นตารางที่แสดงถึงค่า P-value odds ratio และ 95% CI พบว่าจีโนไทป์ทั้ง 3 มีค่า P-value มากกว่า 0.05 จึงสรุปได้ว่าจีโนไทป์ทั้ง 3 ไม่มีความสัมพันธ์กับมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC

ตารางที่ 4.3 ค่า P-value, OR และ 95%CI ของจีโนไทป์ทั้งหมด

Genotype	OR (95%CI)	P-value
CC	1.461 (0.917-2.326)	0.110
CT	0.727 (0.453-1.165)	0.184
TT	0.263 (0.027-2.548)	0.327

rs966423 มี risk allele คือแอลลีล C โดยในผู้ป่วยมีค่าความถี่แอลลีล C เท่ากับ 0.90 ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีค่าความถี่แอลลีล C เท่ากับ 0.86 ดังตารางที่ 4.4 มีค่า odds ratio เท่ากับ 1.45 (95%CI = 0.95-2.23, p-value = 0.08) ซึ่งแสดงว่าความถี่ของ risk allele ไม่มีความแตกต่างกันในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งไทรอยด์ชนิด DTC และกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 4.4 ผลการคำนวณค่าทางสถิติ risk allele ของ rs966423

Allele	Control (allele frequency)	DTC patients (allele frequency)	OR (95%CI) <sup>1</sup>	P-value
C*	305 (0.86)	400 (0.90)	1.45 (0.95-2.23)	0.08
T	51 (0.14)	46 (0.10)		

<sup>1</sup> OR=odd ratio and 95%CI=95% confidence interval

\* Risk allele

จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติผลการศึกษาค่าความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์และแอลลีลของ rs966423 กับมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC ในประชากรไทยเพศหญิง พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กับมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC ซึ่งแสดงค่าทางสถิติดังตารางที่ 4.5 และการวิเคราะห์ผลทางสถิติผลการศึกษาค่าความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์และแอลลีลของ rs966423 กับมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC ในประชากรไทยเพศชาย พบว่าจีโนไทป์ CC และจีโนไทป์ CT มีความสัมพันธ์กับมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC โดยจีโนไทป์ CC มีค่า odd ratio เท่ากับ 3.55 (95% CI = 1.20-10.46, p-value = 0.018) และจีโนไทป์ CT มีค่า odd ratio เท่ากับ 0.32 (95% CI = 0.11-0.94, p-value = 0.033) แต่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ TT และมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC อีกทั้งยังพบความสัมพันธ์ระหว่างแอลลีล C และมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC โดยมีค่า odd ratio เท่ากับ 3.25 (95% CI = 1.20-8.86, p-value = 0.016) ดังตารางที่ 4.6



ตารางที่ 4.5 ผลการคำนวณค่าทางสถิติในตัวอย่างเพศหญิง

Genotype	Control group	DTC patients	OR (95%CI)	P-value
CC	105	140	1.16 (0.69-1.97)	0.57
CT	32	38	0.90 (0.53-1.54)	0.70
TT	2	1	0.36 (0.03-4.29)	0.58
Total	139	179		
<b>Allele</b>				
C	242 (0.87)	318 (0.89)	0.18 (0.73-1.91)	0.49
T	36 (0.13)	40 (0.11)		

ตารางที่ 4.6 ผลการคำนวณค่าทางสถิติในตัวอย่างเพศชาย

Genotype	Control group (allele frequency)	DTC patients (allele frequency)	OR (95%CI)	P-value
CC	25	38	3.55 (1.20-10.46)	0.018*
CT	13	6	0.32 (0.11-0.94)	0.033*
TT	1	0	-	0.470
Total	39	44		
<b>Allele</b>				
C	63(0.81)	82(0.93)	3.25 (1.20-8.86)	0.016*
T	15(0.19)	6(0.07)		

\*มีความสัมพันธ์กับมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95%

## บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

จากผลการสกัดดีเอ็นเอพบว่ามีความเข้มข้นของดีเอ็นเอมากกว่า 80 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรและมีความเข้มข้นน้อยกว่า 80 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ซึ่งตัวอย่างที่มีดีเอ็นเอมากกว่า 80 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรจะเจือจางให้มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป็น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ส่วนตัวอย่างดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นน้อยกว่า 80 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรจะนำมาใช้ในการทดลองโดยไม่ทำการเจือจาง ซึ่งเหตุผลของการเจือจางดีเอ็นเอคือเพื่อให้ตัวอย่างมีความเข้มข้นของดีเอ็นเอเท่ากันหรือใกล้เคียงกันมากที่สุด อีกทั้งทำให้ตัวอย่างมีปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้ทดลองมากเพียงพอที่จะไปทำการทดลองซ้ำและใช้ในการทดลองอื่น ๆ

จากการออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Primer3 พบปัญหาคือไพรเมอร์ ที่ออกแบบได้ไม่มีเอนไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถจดจำได้ จึงต้องทำการออกแบบใหม่ด้วยตนเอง โดยใช้วิธีทำ mutagenesis เปลี่ยนเบสในตำแหน่งใกล้เคียงกับบริเวณของ rs966423 เปลี่ยนจากเบส A เป็นเบส C ซึ่งห่างจาก rs966423 2 bp ทำให้มีเอนไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถจดจำตำแหน่งบริเวณ SNP ได้ การทำ mutagenesis จะต้องออกแบบไพรเมอร์ให้ถึงบริเวณที่ต้องการจะเปลี่ยนแปลง ดังนั้น forward primer จึงมีความยาวมากกว่า reverse primer นั่นคือมีความยาว 40 bp ในขณะที่ reverse primer ยาว 20 bp

ขั้นตอนของการทำพีซีอาร์ระหว่างทำการทดลองมีผลของการทดลองที่ไม่เป็นไปตามคาดเกิดขึ้นหลายอย่างเช่นมีตัวอย่างที่ทำพีซีอาร์ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอจึงทำการทดลองซ้ำอีกครั้งโดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจาก 1 ไมโครลิตรเป็น 2 ไมโครลิตร ซึ่งสาเหตุที่ทำพีซีอาร์แล้วไม่พบดีเอ็นเอของตัวอย่างอาจเกิดจากเทคนิคของผู้ทำการทดลองเองหรือคุณภาพของดีเอ็นเอไม่ดีเพราะเป็นตัวอย่างที่เก็บไว้นานแล้ว ในกรณีของดีเอ็นเอที่มีคุณภาพไม่ดีอาจส่งผลการจับของไพรเมอร์ ขั้นตอนการทำพีซีอาร์ผู้ทดลองจะทำการเพิ่มปริมาณของ  $MgCl_2$  เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็น 3-5 ไมโครลิตรและเพิ่มจำนวนรอบการทำพีซีอาร์จากปกติ 35 รอบเป็น 40 รอบ จากการทดลองดังกล่าวพบว่ามีความเข้มข้นของดีเอ็นเอไม่พบแถบดีเอ็นเอในขั้นตอนการทำพีซีอาร์เป็นเพราะลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่ศึกษาเสียหายไป สามารถตรวจสอบได้โดยการนำดีเอ็นเอมาตรวจสอบด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ซึ่งตัวอย่างที่มีดีเอ็นเอเสียหายไปจะไม่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ขั้นตอนการปมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจะเลือก PCR product ที่มีแบนเข้มหากแบนจางกว่า ladder จะเพิ่มปริมาณ PCR product จากปกติใช้ PCR product 7 ไมโครลิตรเพิ่มเป็น 9-12 ไมโครลิตรเพื่อเป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอให้มากขึ้น ทำให้เห็นแถบดีเอ็นเอของการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชัดเจนมากขึ้น ผลการทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสจีโนไทป์ CC พบแถบดีเอ็นเอ 1 แถบขนาด 218 bp จีโนไทป์ CT พบ 2 แถบขนาด 218 bp และ 176 bp ซึ่งจะไม่พบแถบดีเอ็นเอขนาด 42 bp เนื่องจากมีขนาดดีเอ็นเอเล็กเกินไปจึงตกเจลส่งผลให้มองไม่พบแถบดีเอ็นเอขนาด 42 bp และจีโนไทป์ TT พบ 1 แถบขนาด 176 bp ดังนั้นถึงแม้ว่าจะไม่พบแถบดีเอ็นเอขนาด 42 bp แต่สามารถวิเคราะห์ผลจีโนไทป์ได้

rs96423 เป็น SNP ที่อยู่ในยีน *DIRC3* ซึ่งมีการรายงานครั้งแรกว่าการเกิด *DIRC3-HSPBAP1* translocation บริเวณ t(2;3)(q35;q21) จะส่งผลกระทบต่อการทำงานของยีน *HSPBAP1* ในเซลล์ไตทำให้มีการเจริญของมะเร็งไต (Bodmer et al., 2003) และ rs966423 เป็นตำแหน่งของ CTCF protein-binding site ซึ่งเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน โดยมีการศึกษาพบว่าในผู้ป่วยมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC จะมีการทำงานของโปรตีน CTCF ต่ำกว่าคนปกติ (Wang et al., 2013)

จากผลการศึกษาความสัมพันธ์ของ rs966423 และมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC ในประชากรไทยพบความสัมพันธ์ของมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC ในประชากรไทยเพศชาย โดยถ้าพบแอลลีล C ในเพศชายจะมีความเสี่ยงที่จะเป็นมะเร็งต่อมไทรอยด์มากกว่าแอลลีล T 3.25 เท่า แต่ไม่พบความสัมพันธ์กับมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC ในเพศหญิงและประชากรรวม เนื่องจากมีค่า odds ratio เท่ากับ 1.45 (95%CI = 0.95-2.23, p-value = 0.08) ซึ่งแตกต่างกับการศึกษาก่อนหน้านี้ในประชากรประเทศอื่น ๆ เพราะประชากรจีนและเกาหลี พบความสัมพันธ์ของ rs966423 และมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC รวมถึงอเมริกา ไอร์แลนด์ เนเธอร์แลนด์ โปแลนด์ (Guo et al., 2014) และไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง rs966423 และมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC เหมือนกันกับประชากรสเปน ฝรั่งเศส (Maillard et al., 2015) และคิวบา ซึ่งการไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง rs966423 และมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC อาจเกิดจากปริมาณตัวอย่างที่น้อยเกินไป การเพิ่มตัวอย่างของประชากรอาจทำให้พบความสัมพันธ์ระหว่าง rs966423 และมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC หรือเป็นเพราะในการศึกษานี้ศึกษา SNP เพียงตำแหน่งเดียว ซึ่งความสัมพันธ์ระหว่าง SNP และมะเร็งต่อมไทรอยด์อาจเกิดจาก SNPs หลาย ๆ ตำแหน่ง การมีความสัมพันธ์ระหว่าง SNP กับ SNP รวมถึงการวิเคราะห์ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมร่วมด้วย เช่น ปริมาณรังสีไอออไนซ์หรือปริมาณของไอโอดีนที่ได้รับ (Gou et al., 2014)

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง rs966423 และมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC จะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการเป็นข้อมูลทางอณูพันธุศาสตร์เพื่อใช้ประกอบการศึกษาในอนาคต และเป็นข้อมูลความหลากหลายของ SNPs ที่เกี่ยวข้องกัมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC

## เอกสารอ้างอิง

- มลิวรรณ สุคันธพันธ์ และ ทิพย์วรรณ อรัญดร. 2555. *มะเร็งกับพันธุศาสตร์*. กรุงเทพฯ : HOCC-PSU.
- American Cancer Society. 2018. *Cancer facts & figures 2018*. Atlanta, USA : American Cancer Society.
- Asif, F., Ahmad, M.R., Majid, A. 2015. Risk factors for thyroid cancer in females using a logit model in Lahore, Pakistan. *Asian Pacific Journal Cancer Prevention* 16 : 6243-6247.
- Bashir, K., Sarwar. R., Saeed, S., Mahjabeen, I., and Kayani, M.A. 2018. Interaction among susceptibility genotypes of *PARP1* SNPs in thyroid carcinoma. *Public Library of Science* 13 : 1-12.
- Bodmer, D., Schepens, M., Eleveld, M.J., Schoenmakers, E.F.P.M., and Kessel, A.G.V. 2003. Disruption of a novel gene, *DIRC3*, and expression of *DIRC3-HSPBAP1* fusion transcripts in a case of familial renal cell cancer and t(2;3)(q35;q21). *Gene, Chromosome & Cancer* 38 : 107-116.
- Chacon-Cortes, D., and Griffiths, L.R. 2014. Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives. *Journal of Biorepository Science for Applied Medicine* 2 : 1-9.
- Chavan, A. 2018. Germline mutation Vs. somatic mutation: a comparison you wanted. *Biology Wise* [online]. Available from : <https://biologywise.com/germline-mutation-vs-somatic-mutation> [2018, Oct1]
- Chien, W., and Koeffler, H.P. 2012. Molecular biology. In G.D. Braunstein (ed.), *Thyroid cancer*, pp.35-43. Dordrecht, Netherlands : Springer.
- Clayman, G. 2018. Thyroid cancer. *Endocrineweb* [online]. Available from : <https://www.endocrineweb.com/conditions/thyroid-cancer/thyroid-cancer> [2018, Sep30]
- Elisei, R., et al. 2013. Cabozantinib in progressive medullary thyroid cancer. *Journal of Clinical Oncology* 31 : 3639-3647.
- European Bioinformatics Institute. 2018. What are genome wide association studies (GWAS)?. *Train online* [online]. Available from : <https://www.ebi.ac.uk/training/online/course/gwas-catalog-exploring-snp-trait-associations/why-do-we-need-gwas-catalog/what-are-genome> [2018, Oct1]
- Goundan, P.N., and Lee, S.L. 2013. Differentiated thyroid cancer. In *Endocrinology metabolism 2<sup>nd</sup>*, pp.1-13. Wilmington, USA : Decision Support in Medicine.

- Gudmundsson, J., et al. 2009. Common variants on 9q22.33 and 14q13.3 predispose to thyroid cancer in European populations. *National Institutes of Health Public Access* 4: 460-464.
- Gudmundsson, J., et al. 2013. Discovery of common variants associated with low TSH levels and thyroid cancer risk. *National Institutes of Health Public Access* 44 : 1038-1046.
- Guo, Sh., et al. 2014. Significant SNPs have limited prediction ability for thyroid cancer. *Cancer Medicine* 3 : 731-735.
- Ho, Y.S., et al. 2016. Genome-wide association and expression quantitative trait loci studies identify multiple susceptibility loci for thyroid cancer. *Nature Communication* 8 : 1-12.
- Howell, G.M., Hodak, S.P., and Yip, L. 2013. RAS mutations in thyroid cancer. *The Oncologist* 18 : 926-932.
- Hwangbo, y., et al. 2018. Genome-wide association study reveals distinct genetic susceptibility of thyroid nodules from thyroid cancer. *Clinical Endocrinology & Metabolism* 103 : 1-20.
- Jendrzewski, J., et al. 2016. Papillary thyroid carcinoma: association between germline DNA variant markers and clinical parameters. *Thyroid* 26 : 1276-1284.
- Lister Hill National Center for Biomedical Communications. 2019. Single nucleotide polymorphisms (SNPs). *Genetics Home Reference* [Online]. Available from : <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/genomicresearch/snp> [2019, Feb 23]
- Liu, R., and Xing, M. 2016. TERT promoter mutations in thyroid cancer. *Health & Human Services Public Access* 23 : 1-23.
- Livolsi, V.A. 2011. Papillary thyroid carcinoma: an update. *Modern Pathology* 24 : 51-59.
- Liyararachchi, S., et al. 2013. Cumulative risk Impact of five genetic variants associated with papillary thyroid carcinoma. *Thyroid* 23 : 1532-1540.
- Maillard, S., et al. 2015. Common variants at 9q22.33, 14q13.3, and ATM loci, and risk of differentiated thyroid cancer in the French Polynesian population. *PLOS One* 10 : 1-14.
- Medarde, A.F., and Santos, E. 2011. Ras in cancer and developmental diseases. *Genes Cancer* 2 : 344-358.
- Mustafa, M., et al. 2017. Thyroid cancer: clinical manifestations, diagnosis and therapy. *Dental and Medical Sciences* 16 : 93-98.
- Nettore, I.C., Colao, A., and Macchia, P.E. 2018. Nutritional and environmental factors in thyroid carcinogenesis. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 15 : 1-11.

- Nguyen, Q.T., et al. 2015. Diagnosis and treatment of patients with thyroid cancer. *Am Health Drug Benefits* 8 : 30-40.
- Nikiforov, Y.E. 2002. RET/PTC rearrangement in thyroid tumors. *Endocrine Pathology* 13 : 3-16.
- Pereda, C.M., et al. 2015. Common variants at the 9q22.33, 14q13.3 and ATM loci, and risk of differentiated thyroid cancer in the Cuban population. *BioMed Central Genetics* 16 : 1-9.
- Pich, O., et al. 2018. Somatic and germline mutation periodicity follow the orientation of the DNA minor groove around nucleosomes. *Cell* 175 : 1074-1087.
- Rahbari, R., Zhang, L., and Kebebew, E. 2010. Thyroid cancer gender disparity. *National Institutes of Health Public Access* 11 : 1771-1779.
- Rasmussen, H.B. 2012. Restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments (PCR- RFLP). In S. Magdeldin (Ed.), *Gel electrophoresis-principles and basics*, pp.315-334. Rijeka, Croatia : Intech.
- Rebai, M., and Rebai A. 2016. Molecular genetics of thyroid cancer. *Genetics Research* 98 : 1-11.
- Roelli, M.A., et al. 2017. PIK3CAH1047R-induced paradoxical ERK activation results in resistance to BRAFV600E specific inhibitors in BRAFV600E PIK3CAH1047R double mutant thyroid tumors. *Oncotarget* 8 : 103207-103222.
- Saenko, V.A., and Rogounovitch, T.I. 2018. Genetic Polymorphism predisposing to differentiated thyroid cancer: a review of major findings of the genome-wide association studies. *Endocrinology and Metabolism* 33 : 164-174.
- Santarpia, L., Myers, J.N., Sherman, S.I., Trimarchi, F., Clayman, G.L., and Nagger, A.E. 2010. Genetic alterations in the ras/raf/mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase/akt signaling pathways in the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *Cancer* 116 : 2971-2983.
- Shen, Z., et al. 2016. *DIRC3* and near *NABP1* genetic polymorphisms are associated laryngeal squamous cell carcinoma patient survival. *Oncotarget* 7 : 79596-79604.
- Sud, A., Kinnersley, B., and Houlston, R.S. 2017. Genome-wide association studies of cancer: current insights and future perspectives. *Springer Nature* 17 : 692-702.
- Swierniak, M., et al. 2015. Association between GWAS-Derived rs966423 genetic variant and overall mortality in patients with differentiated thyroid cancer. *Clinical Cancer Research* 22 : 1111-1120.
- Tang, K.T., and Lee, C.H. 2010. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma: pathogenic role and clinical implications. *Chinese Medical Association* 73 : 113-128.

- Tangjaturonrasma, N., Vatanasapt, P., and Bychkov, A. 2017. Epidemiology of head and neck cancer in Thailand. *Asia-pacific Journal of Clinical Oncology* 14 : 16-22.
- Verburg, F.A., Brans, B., and Mottaghy, F.M. 2011. Molecular nuclear therapies for thyroid carcinoma. *Methods* 55 : 230-237.
- Wang, F., et al. 2016. rs965513 polymorphism as a common risk marker is associated with papillary thyroid cancer. *Oncotarget* 7 : 41336-41345.
- Wang, Y.L., et al. 2013. Confirmation of papillary thyroid cancer susceptibility loci identified by genome-wide association studies of chromosomes 14q13, 9q22, 2q35 and 8p12 in a Chinese population. *Cancer Genetic* 0 : 1-7.
- Wei, W.J., et al. 2015. Clinical significance of papillary thyroid cancer risk loci identified by genome-wide association studies. *Cancer Genetics* 208 : 68-75.
- Wen, J.W., et al. 2015. Clinical significance of papillary thyroid cancer risk loci identified by genome-wide association studies. *Cancer Genetics* 208 : 68-75.
- Yoon, S., et al. 2015. Relation between F-18 FDG uptake of PET/CT and BRAFV600E mutation in papillary thyroid cancer. *Medicine* 94 : 1-8.
- Zhu, J., Qi, P., and Li, Z. 2018. Interaction between XRCC1 gene polymorphisms and obesity on susceptibility to papillary thyroid cancer in Chinese Han population. *Cellular Physiology and Biochemistry* 49 : 638-644.
- 1000Genomes. 2018. Rs966423. *National Center for Biotechnology Information* [online]. Available from : [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs966423#frequency\\_tab](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs966423#frequency_tab) [2019,May14]

# ภาคผนวก



ข้อมูลตัวอย่างที่ใช้ทำการทดลอง โดยแสดงถึงหมายเลขตัวอย่าง เพศ อายุ และจีโนไทป์ที่พบ ดังตารางที่ 6.1 ของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC และ ตารางที่ 6.2 ของกลุ่มควบคุม

**ตารางที่ 6.1** ข้อมูลตัวอย่างที่ใช้ทำการทดลองกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC

Sample code	Gender	Age	Genotype
RS-P3	F	79	CC
RS-P8	F	51	CC
RS-P10	F	27	CC
RS-P11	F	56	CC
RS-P12	F	54	CC
RS-P13	F	58	CC
RS-P14	F	48	CC
RS-P15	F	39	CT
RS-P16	F	20	CC
RS-P17	F	58	CC
RS-P18	F	44	CC
RS-P19	F	74	CT
RS-P21	F	47	CC
RS-P24	F	55	CT
RS-P25	F	55	CT
RS-P27	F	34	CC

Sample code	Gender	Age	Genotype
RS-P32	M	66	CC
RS-P44	F	27	CC
RS-P48	F	40	CC
RS-P52	F	46	CC
RS-P53	F	61	CC
RS-P56	F	82	CC
RS-P59	F	56	CC
RS-P61	F	48	CC
RS-P64	F	44	CT
RS-P65	M	45	CC
RS-P67	M	55	CT
RS-P68	F	52	CC
RS-P69	F	56	CC
RS-P70	F	49	CT
RS-P71	F	42	CC
RS-P72	F	53	CC
RS-P74	M	81	CC
RS-P77	F	38	CC
RS-P79	F	21	CC

Sample code	Gender	Age	Genotype
RS-P81	M	64	CT
RS-P84	M	78	CC
RS-P85	F	63	CC
RS-P86	F	44	CC
RS-P88	F	50	CC
RS-P90	M	65	CC
RS-P91	F	57	CC
RS-P92	F	53	CT
RS-P98	F	54	CT
RS-P99	F	49	CC
RS-P102	F	45	CT
RS-P103	M	55	CC
RS-P106	F	53	CC
RS-P107	F	48	CC
RS-P110	M	38	CC
RS-P117	F	57	CC
RS-P118	F	57	CC
RS-P122	F	44	CC
RS-P123	F	65	CC

Sample code	Gender	Age	Genotype
RS-P125	F	22	CC
RS-P127	F	53	CT
RS-P131	F	55	CC
RS-P133	F	60	CC
RS-P134	F	19	CC
RS-P136	F	59	CT
RS-P137	M	33	CC
RS-P142	M	65	CT
RS-P144	F	36	CT
RS-P147	F	48	CT
RS-P152	M	63	CC
RS-P153	F	58	CC
RS-P160	F	42	CC
RS-P161	F	58	CC
RS-P164	F	58	CC
RS-P167	F	75	CC
RS-P169	F	52	CC
RS-P171	F	27	CC
RS-P173	F	28	CC

Sample code	Gender	Age	Genotype
RS-P174	F	57	CC
RS-P177	M	76	CC
RS-P179	M	87	CC
RS-P180	M	62	CC
RS-P182	F	38	CC
RS-P187	F	66	CC
RS-P188	F	69	CC
RS-P189	M	41	CC
RS-P191	F	55	CC
RS-P192	F	53	CC
RS-P194	F	71	CC
RS-P195	M	67	CC
RS-P197	F	48	CT
RS-P201	F	64	CC
RS-P202	F	45	CC
RS-P203	F	40	CC
RS-P205	F	68	CT
RS-P206	F	52	CC
RS-P210	F	55	CC

Sample code	Gender	Age	Genotype
6255	F	51	CT
6256	F	71	CC
7005	M	76	CC
7011	F	26	CC
7014	F	25	CC
7020	F	57	CC
7021	M	68	CC
7023	F	40	CC
7024	F	33	CT
7025	F	31	CC
7065	F	46	CC
7073	F	45	CC
7094	F	47	CC
7201	F	41	CC
7206	F	43	CC
7207	F	20	CC
7209	F	59	CC
7211	F	41	CT
7218	F	64	CC

Sample code	Gender	Age	Genotype
7223	F	41	CT
7231	F	45	CT
7236	F	31	CC
7249	M	69	CT
7252	F	26	CT
7253	F	49	CT
7257	F	51	CC
7260	F	37	CC
7262	F	61	CC
7271	F	39	CC
7274	M	34	CC
7282	M	48	CC
7290	F	55	CC
7370	F	65	CT
7372	M	18	CC
7374	F	37	CC
7376	F	49	CC
7380	F	60	CC
7381	F	56	CC

Sample code	Gender	Age	Genotype
7386	F	29	CC
7389	F	38	CC
7395	F	49	CC
7396	F	42	CC
7412	M	55	CC
7414	F	58	CC
7419	F	28	CC
7420	F	51	CC
7428	F	61	CC
7433	F	52	CC
7434	F	37	CC
7442	F	33	CC
7444	F	50	TT
7457	M	57	CC
7458	F	67	CC
7466	F	53	CC
7467	F	85	CT
7469	F	29	CC
7473	F	40	CC



Sample code	Gender	Age	Genotype
7479	F	50	CC
7550	M	57	CC
7551	M	67	CC
7552	F	49	CC
7554	F	66	CT
7556	F	47	CC
7557	F	65	CC
7560	F	84	CT
7563	F	50	CT
7565	F	64	CC
7566	M	71	CC
7569	F	60	CC
7579	F	59	CC
7585	F	52	CC
7592	M	65	CC
7604	M	55	CC
7609	F	57	CC
7610	M	29	CC
7612	M	70	CC

Sample code	Gender	Age	Genotype
7613	F	55	CC
7615	M	63	CC
7617	F	50	CC
7627	F	56	CC
7629	F	25	CT
7632	M	63	CC
7640	F	64	CC
7656	F	39	CC
7657	F	53	CC
7662	M	63	CC
7665	F	46	CC
7669	F	47	CC
7670	F	62	CC
7694	F	21	CC
7701	F	37	CC
7703	M	53	CC
7706	F	34	CC
7707	M	71	CC
7714	F	78	CC

Sample code	Gender	Age	Genotype
7723	M	68	CC
7727	F	73	CC
7735	F	48	CT
7738	F	24	CT
7739	F	58	CC
7740	M	48	CC
7742	F	34	CC
7743	F	32	CT
7793	F	56	CC
7797	F	31	CC
7798	F	-	CC
7800	F	50	CC
7801	F	44	CT
7804	F	-	CT
7806	F	39	CT
7807	F	54	CC
7810	F	53	CC
7811	F	40	CC
7813	M	58	CC

Sample code	Gender	Age	Genotype
7814	F	30	CT
7815	F	83	CC
7824	F	25	CC
7825	M	75	CC
7826	F	43	CT
7827	M	54	CC
7835	F	57	CC
7838	F	36	CC
7839	F	31	CC
7840	F	50	CC
7841	F	41	CT
7846	M	25	CT
7847	F	43	CT
7849	F	41	CC
7852	F	70	CT
7853	F	44	CC
7854	F	57	CC

ตารางที่ 6.2 ข้อมูลตัวอย่างที่ใช้ทำการทดลองกลุ่มควบคุม

Sample code	Gender	Age	Genotype
C-01	F	35	CC
C-02	F	21	CC
C-03	F	36	CC
C-04	F	21	CT
C-06	F	22	CC
C-07	F	24	CC
C-08	F	21	CC
C-09	M	21	CT
C-10	F	23	CT
C-11	F	21	CC
C-12	M	22	CC
C-13	M	22	CT
C-14	M	22	CT
C-15	M	22	CC
C-16	M	20	CC
C-17	M	23	CC
C-18	M	69	CC
C-19	F	63	CC

Sample code	Gender	Age	Genotype
C-20	M	41	CC
C-21	F	34	CT
C-22	F	22	CC
C-23	F	22	CC
C-24	F	22	CT
C-25	F	24	CC
C-26	F	23	CC
C-27	M	32	CC
C-29	F	21	CC
C-30	F	21	CC
C-31	M	23	CC
C-32	F	20	CC
C-33	F	22	CC
C-34	F	21	CC
C-35	F	20	CC
C-36	F	21	CC
C-37	F	21	CC
C-38	M	21	CC
C-39	F	21	TT

Sample code	Gender	Age	Genotype
C-40	F	21	CC
C-41	M	21	CC
C-42	F	60	CC
C-43	F	29	CC
C-44	F	-	CC
C-45	M	72	CC
C-46	M	53	CC
C-47	F	50	CC
C-48	M	43	CT
C-49	F	41	CC
C-50	F	22	CC
C-51	F	87	CC
C-52	F	21	CC
C-53	M	21	CC
C-54	M	21	CT
C-55	F	21	CC
C-56	M	21	CT
C-57	F	20	CC
C-58	M	22	CT

Sample code	Gender	Age	Genotype
C-59	M	21	CT
C-60	M	21	CC
C-61	F	21	CC
C-62	M	21	CC
C-63	F	40	CC
C-64	M	33	TT
C-65	F	20	CC
C-311	F	29	CC
C-314	M	31	CC
C-316	F	26	CC
C-318	F	23	CC
C-319	F	34	CC
C-320	F	27	CT
C-321	F	24	CC
C-322	F	29	CC
C-323	M	34	CT
C-325	M	33	CT
C-326	F	50	CC
C-335	M	34	CC



Sample code	Gender	Age	Genotype
C-337	F	25	CC
C-339	F	27	CT
C-341	F	26	CC
C-342	F	24	CC
C-350	F	-	CC
C-356	M	26	CT
C-358	F	33	CC
C-361	F	27	CC
C-362	M	23	CC
C-363	F	24	CT
C-368	F	25	CC
C-369	M	24	CT
C-370	F	22	CT
C-371	F	23	CT
C-374	F	24	CC
C-375	F	25	CC
C-378	F	30	CT
C-379	F	27	CC
C-383	M	28	CC

Sample code	Gender	Age	Genotype
C-384	F	55	CC
C-385	F	30	CC
C-387	F	27	CT
C-388	F	25	CT
C-389	M	28	CC
C-390	F	36	CC
C-391	F	33	CT
C-392	F	23	CT
C-399	F	21	CC
C-401	F	21	CC
C-402	F	21	CT
C-405	F	21	CC
C-414	F	24	CT
C-415	F	26	CT
C-416	F	24	CC
C-417	F	24	CC
C-419	F	30	CC
C-464	F	42	CC
C-470	F	49	CC

Sample code	Gender	Age	Genotype
C-471	F	66	CC
C-473	F	46	CC
C-474	F	35	CC
C-494	F	42	CC
C-496	F	53	CC
C-497	F	41	CT
C-502	F	55	CC
C-504	F	30	CT
C-505	F	43	CT
C-507	F	40	CC
C-510	F	47	CC
C-511	F	55	CC
C-512	M	35	CC
C-513	F	41	CT
C-514	F	24	CC
C-515	F	28	CC
C-516	F	30	CC
C-517	M	36	CC
C-525	F	55	CC

Sample code	Gender	Age	Genotype
C-530	F	23	CC
C-531	F	28	CT
C-532	F	22	CC
C-533	M	28	CT
C-535	F	40	CT
C-537	F	20	CT
C-538	F	33	CC
C-540	F	29	CC
C-541	F	37	CC
C-544	F	37	CC
C-546	F	34	CT
C-547	F	23	CC
C-548	F	24	CC
C-551	F	27	CT
C-552	F	32	CC
C-553	F	19	CC
C-554	F	21	CC
C-555	F	33	CC
C-557	F	29	CC

Sample code	Gender	Age	Genotype
C-558	F	22	CC
C-559	F	19	CT
C-560	F	30	CT
C-561	F	26	CC
C-564	F	26	CC
C-568	F	24	CC
C-575	F	19	CC
C-576	F	27	CC
C-577	F	23	CC
C-579	F	28	CC
C-585	F	19	CC
C-586	F	39	CC
C-611	F	41	CT
C-612	F	32	CT
C-613	F	30	TT
C-614	F	27	CC
C-615	F	45	CC
C-616	F	30	CC
C-617	F	42	CC

Sample code	Gender	Age	Genotype
C-618	F	34	CC
C-619	F	40	CT
C-620	F	50	CT
C-621	F	30	CC
C-622	M	50	CC
C-623	M	54	CC
C-624	F	27	CC
C-625	M	41	CC